

LES RECEPTEURS ADRENERGIQUES DES
MELANOPHORES DU FUNDULUS HETEROCLITUS

Rita Benoit Moussali

A THESIS
in
The Department
of
Biological Sciences

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for
the Degree of Master of Science at
Sir George Williams University
Montreal, Canada

December, 1972

© Rita Benoit Moussali 1973

ENGLISH ABSTRACT

The responses of the melanophores of Fundulus heteroclitus to adrenergic stimulation following treatment with α - and β - adrenergic blocking agents were studied in vitro, using isolated scales. Colour change was recorded using the Mean Melanophore Index. Confirmatory in vivo, studies were also made using the the Derived Ostwald Index as a measure of colour change.

The melanophores responded by aggregation of melanin granules following treatment with adrenaline and noradrenaline. This response was essentially constant when the pH of the medium was varied between 3.5 and 7.2. The effects of the adrenergic blockers were greatly influenced by pH.

The following observations were made during in vitro experiments with reversible α - adrenergic blockers followed by adrenergic stimulants. Phen tolamine alone produced dispersion of melanin granules. This is attributed to the release by the drug of endogenous noradrenaline which then combines with β -receptors on the melanophore. Addition of adrenaline or noradrenaline elicited aggregation indicating the reversibility of the blockage.

Azapetine alone did not cause dispersion. Adrenaline added following azapetine caused dispersion. Noradrenaline under the same circumstances was ineffective.

Chlorprothixene, a tranquilizer, produced complete blockage.

Dibenamine, an irreversible α -blocker caused dispersion at high doses and in a range of pH from 7.2 to 5.0. At pH 7.2, the addition of adrenaline caused further dispersion but at lower pH, blockage was complete and adrenaline evoked no response.

Phenoxybenzamine gave results similar to those obtained with dibenamine.

EEDQ, an irreversible α -blocker with a different chemical structure to dibenamine and phenoxybenzamine had no effect alone at high doses (100 μ g) but caused aggregation at low doses (25 μ g). The high dose caused complete blockage and adrenaline elicited no response. The low dose blocked only α -receptors and the addition of adrenaline caused dispersion of melanin.

The following β -blockers were used:

Propranolol at 200 μ g and pH 7.2 had no visible effect. The addition of noradrenaline had no effect and it was evident that blockage was complete. At a dose of 10 μ g propranolol did not give a conclusive result.

Oxoprenolol at doses of 30 μ g and 300 μ g had no significant effect.

Prinodolol had no visible effect when used alone, but evidently caused a complete blockage as catecholamines had no effect on treated scales.

Dichloroisoproterenol (DCI) at 250 μ g and pH 6.1 produced aggregation. This may be due to the strong intrinsic sympathomimetic activity of the substance. At pH 7.2 the same dose of DCI had no visible effect on the melanophore, but the addition of catecholamine had no effect also, indicating complete blockage.

By using appropriate α - and β -blockers in sequence, followed by catecholamines, the identity of the receptors was established.

Equal numbers of fish adapted to white and black backgrounds were used in the in vivo experiments and the results were as follows.

Adrenaline and noradrenaline elicited the same response, that of paling. The effects of the substances tested in vitro were similar in vivo but usually not as marked.

In general the results may be summarized as follows. Treatment of the melanophore with an α -blocker followed by catecholamines results in dispersion. Treatment with a β -blocker followed by catecholamines results in aggregation.

These results strongly suggest that there are both α - and β -adrenergic receptors on the membrane of the melanophore, and that they mediate aggregation and dispersion, respectively, in response to adrenergic stimulation. The evidence supports the concept of mononeuronal adrenergic innervation of the melanophore.

REMERCIEMENTS

Ma gratitude s'adresse en premier lieu au Docteur Robert McLaughlin du département de biologie de l'Université Sir George Williams. Par sa disponibilité, sa minutie et son honnêteté intellectuelle, il m'a aidé grandement dans la rédaction de ce texte. C'est à lui que je dois la présentation et l'interprétation statistiques des résultats obtenus tout au long de la recherche qui est à la base de cette thèse.

Je voudrais aussi remercier le Docteur Elaine B. Newman du département de biologie de l'Université Sir George Williams qui comprit mes problèmes d'étudiante graduée, m'offrit sa collaboration et me suggéra de donner à la présentation de ce texte, une plus grande accessibilité.

Je me dois aussi de remercier le Docteur F.S. Abbott, du département de biologie de l'Université Sir George Williams, mon directeur de thèse qui me suggéra le thème de ce travail de recherche.

Merci au Docteur B. Belleau du département de chimie de l'Université McGill, qui accepta de me rencontrer et m'a aidé à interpréter et comparer les résultats de mes recherches à la lumière de sa vaste expérience de chercheur.

C'est dans le monde de l'industrie pharmaceutique que j'ai pu me procurer les produits chimiques et les conseils techniques nécessaires à l'élaboration de ce travail. Ainsi les compagnies pharmaceutiques suivantes ont fourni:

Aldrich, le DICHLOROISOPROTERENOL (DCI)

Bristol, le N-ETHOXYCARBONYL 2 ETHOXY 1- α DIHYDROQUINONE (EEDQ)

Ciba, la PHENTOLAMINE et l'OXPRENOLOL

Hoffman-La Roche, l'AZAPETINE et le CHLORPROTHIXENE

Parke Davis, l'ADRENALINE

Sandoz, le PRINODOLOL

Smith, Kline and French, la DIBENAMINE et la PHENOXYBENZAMINE

Winthrop, la NORADRENALINE.

Je remercie plus particulièrement:

- Le Docteur R. Berman, du laboratoire de pharmacologie de la compagnie Bristol pour ses conseils pratiques qui me furent précieux dans la planification de la recherche et dans l'utilisation des catécholamines et des bloqueurs de type α .

- Le Docteur Remo Denti, Directeur médical de la compagnie Ciba, pour la documentation sur les bloqueurs de type α et β .

- Le Docteur J.R. Mac Dougal, Directeur médical de la compagnie Burroughs Wellcome pour avoir mis à ma disposition une précieuse documentation.

TABLE DES MATIERES

Remerciements	I-II
Table des matières	III-V
Liste des tableaux	VI-VIII
Liste des graphiques	IX-X
1.0 INTRODUCTION	1-14
2.0 MATERIEL ET METHODES	
2.1 Matériel	16-23
2.11 Poissons	16
2.12 Drogues	16-23
2.2 Méthodes	24-31
2.21 Etude <u>in vitro</u>	24-28
2.22 Etude <u>in vivo</u>	29-31
3.0 RESULTATS DE L'ETUDE <u>IN VITRO</u>	
3.1 Traitement des données	33-42
3.2 Les pH	42-43

3.3	Etude des résultats des bloqueurs de type α	43-47
3.31	Les bloqueurs réversibles	48-49
3.32	Les bloqueurs irréversibles	50-51
3.4	Etude des résultats des bloqueurs de type β	52-61
3.5	Etude des résultats des bloqueurs de type α et β suivi de NORADRENALINE	62-63
4.0	RESULTATS DE L'ETUDE <u>IN VIVO</u>	64-71
4.1	Analyse des résultats des témoins	64
4.2	Analyse des résultats des bloqueurs de type α	64
4.3	Analyse des résultats des bloqueurs de type β	68-71
5.0	DISCUSSIONS	
5.1	Etude <u>in vitro</u>	72
5.11	Analyse de la technique	72-74
5.12	Bloqueurs de type α	74-83
5.121	Les bloqueurs réversibles	74-77
5.122	Les bloqueurs irréversibles	77-83
5.13	Bloqueurs de type β	83-86

5.14 Généralités sur l'étude <u>in vitro</u>	86-88
5.15 Bloqueurs de type α et de type β	89-93
5.2 Etude <u>in vivo</u>	94
5.21 Analyse de la technique	94-97
5.22 Etude des bloqueurs de type α	97-98
5.23 Etude des bloqueurs de type β	99-100
BIBLIOGRAPHIE	101-107

LISTE DES TABLEAUX ---

Tableau

1 a	Présentation des drogues utilisées au cours de cette recherche (catécholamines)	18
1 b	Présentation des drogues utilisées au cours de cette recherche (bloqueurs adrénergiques de type α).....	19
1 c	Présentation des drogues utilisées au cours de cette recherche (bloqueurs adrénergiques de type β).....	20
2 a	Solubilité des catécholamines	21
2 b	Solubilité des bloqueurs adrénergiques de type β	22
2 c	Solubilité des bloqueurs adrénergiques de type α	23
3	Résultats obtenus après le traitement des écailles du <u>Fundulus hétéroclitus</u> avec DIBENAMINE 200 μ gm à pH 7.2 suivi d'ADRENALINE 50 μ g (exprimés en I.M.M.)	36
4	Résultats obtenus après le traitement des écailles du <u>Fundulus hétéroclitus</u> avec une solution physiologique à pH 3.5 suivi d'ADRENALINE (exprimés en I.M.M.	38
5	Effets du pH sur la réponse aux catécholamines des écailles du poisson <u>Fundulus hétéroclitus</u> <u>in vitro</u>	44

Tableau

6	Effets des bloqueurs de type α sur la réponse aux catécholamines des écailles du <u>Fundulus hétéroclitus in vitro</u>	46
7	Réaction des mélanophores à l'action des bloqueurs de type α comparée à celle des témoins. Interprétation statistique des résultats <u>in vitro</u>	47
8	Effets des bloqueurs de type β sur la réponse aux catécholamines des écailles du <u>Fundulus hétéroclitus in vitro</u>	53
9	Réaction des mélanophores à l'action des bloqueurs de type β comparée à celle des témoins. Interprétation statistique des résultats <u>in vitro</u>	54
10	Analyse de variance des témoins.....	57
11	Analyse de variance des bloqueurs de type α	58
12	Analyse de variance des bloqueurs de type β	59
13	Analyse de variance totale (témoins, α , β)	60
14	Analyse de variance comparative des témoins	61
15	Effets des bloqueurs de type α et β sur la réponse aux catécholamines des écailles du <u>Fundulus hétéroclitus in vitro</u> (interprétation statistique).....	63

Tableau

16	Moyenne des résultats (Selon l'index d'Ostwald) obtenus après le traitement du <u>Fundulus hétéroclitus in vivo</u> , par la solution saline suivie d'ADRENALINE ou de NORADRENALINE (adaptation initiale en milieu noir).....	65
17 a	Moyenne des résultats obtenus après le traitement des <u>Fundulus hétéroclitus in vivo</u> , par les bloqueurs adrénérgiques de type α suivi d'ADRENALINE (adaptation initiale en milieu noir).....	66
17 b	Moyenne des résultats obtenus après le traitement des <u>Fundulus hétéroclitus in vivo</u> , par les bloqueurs adrénérgiques de type α suivi d'ADRENALINE (adaptation initiale en milieu blanc).....	67
18 a	Moyenne des résultats obtenus après le traitement des <u>Fundulus hétéroclitus in vivo</u> , par les bloqueurs adrénérgiques de type β suivi d'ADRENALINE (adaptation initiale en milieu noir).....	69
18 b	Moyenne des résultats obtenus après le traitement des <u>Fundulus hétéroclitus in vivo</u> , par les bloqueurs adrénérgiques de type β suivi d'ADRENALINE (adaptation initiale en milieu blanc).....	70

LISTE DES GRAPHIQUES

Graphique

- 1 Action de l'ADRENALINE après blocage
des mélanophores du Fundulus hétéro-
clitus avec la DIBENAMINE 200 μ gm à
différents pH 45

- 2 Courbe représentant la réaction des
mélanophores du Fundulus hétéroclitus
pendant les étapes de stabilisation,
d'addition du bloqueur ou de la solu-
tion physiologique et de l'action sub-
séquente des catécholamines 88

Je dédie cette thèse à Molière
qui fait dire au Misanthrope :

"Je hais tous les hommes,
les uns, parce qu'ils sont méchants et malfaisants,
les autres, parce qu'ils sont aux méchants complaisants".

1.0 INTRODUCTION

1.0 INTRODUCTION

"To most of the modern pharmacologist the receptor is like a beautiful but remote lady. He has written her many letter and quite often she has answered the letters. From these answers the pharmacologist has built himself an image of this fair lady. He cannot, however, truly claim ever to have seen her, although one day he may do so" de Jongh (1964) cité par Hodge (1964).

Dès le début du 19e siècle, des chercheurs tentèrent de mettre en évidence la transmission chimique de l'influx nerveux dans le système nerveux sympathique. A cette époque, plusieurs chercheurs avaient réalisé que la réponse aux amines sympathomimétiques persistait dans les tissus même après la dégénérescence ou la dénervation du neurone sympathique. Ils furent donc obligés de recourir à la notion théorique de "récepteur" pour expliquer l'action de ces amines.

En 1906, Dale s'aperçut que s'il traitait différents tissus de mammifères avec des préparations d'ergot, il obtenait dans plusieurs cas, un renversement et dans d'autres (par ex. le coeur) une inhibition des effets de l'adrénaline exogène ou de la stimulation nerveuse adrén-

nergique. Il émit donc l'hypothèse que l'administration de l'ergot modifiait les effets des médiateurs chimiques sur le récepteur. Il suggéra aussi que le système nerveux adrénergique sécrétait deux substances chimiques différentes, la SYMPATHINE I et E et que le "récepteur" produisait avec chacune d'elles, une réponse physiologique différente.

Il fallut attendre jusqu'en 1948 où Ahlquist, étudiant la réponse de nombreux tissus de mammifères aux différentes amines sympathomimétiques, postula la présence de deux types de récepteurs en remplacement de la théorie de Dale qui postulait deux types de médiateurs chimiques sur un seul récepteur. Ahlquist (1948) s'appuya sur la réaction différente des tissus aux amines sympathomimétiques pour classifier les récepteurs en deux groupes, les uns, normalement associés aux réponses excitatrices, furent appelés les récepteurs de type α , et les autres, aux réponses inhibitrices, les récepteurs de type β . La dénomination en α et β fut préférée à celle d'excitation et d'inhibition à cause de plusieurs exceptions rencontrées. Les deux principales exceptions sont, l'inhibition de l'intestin associée à une stimulation des récepteurs de type α , et l'excitation du myocarde, à une stimulation des récepteurs de type β . Ainsi, selon la classification de Ahlquist, les vaisseaux sanguins du muscle lisse se contractent en réponse à une stimulation du système nerveux adrénergique, grâce aux

récepteurs de type α , et se dilatent par l'intermédiaire des récepteurs de type β .

La découverte pharmacologique de bloqueurs adrénergiques de type α tel la PHENOXYBENZAMINE et la PHENTOLAMINE a permis de répéter les expériences de Dale avec l'ergot et de reproduire le renversement de l'ADRENALINE. Cependant, ce n'est qu'en 1957, que le premier bloqueur adrénergique de type β , le DICHLOROISOPROTERENOL (DCI) fut synthétisé. Ce bloqueur antagonise l'action des amines sympathomimétiques dans leur vasodilatation et non dans leur vasoconstriction comme le font les bloqueurs adrénergiques du type α . De plus, le DCI est incapable d'antagoniser la vasodilatation produite par l'histamine ou par l'acétylcholine confirmant ainsi sa spécificité pour les récepteurs adrénergiques et appuyant la notion des deux types de récepteurs adrénergiques. Depuis lors, plusieurs autres bloqueurs ont été produits, eux aussi confirment l'existence de ces deux types de récepteur. Malgré l'importance de ce concept, nous ne devons pas perdre de vue qu'il ne s'agit que d'une hypothèse qui sert à simplifier notre travail. Ce concept est en effet nécessaire pour décrire le mode d'action des drogues, la réponse des tissus, les relations structure-activité, mais elle n'explique pas la véritable nature de l'interaction drogue-tissu. Elle sert à orienter notre recherche vers d'autres domaines comme la synthèse de bloqueurs de plus en plus spécifiques. Cette méthode d'analyse est donc précieuse pour le scientifique et lui permet de mieux percevoir le récepteur sans jamais l'avoir "vu" ou isolé. Cette façon de procéder est semblable à celle que l'on utilise dans la classification des anticorps. Celle-ci est basée sur la réponse

antigène-anticorps et ne nécessite pas l'isolement de l'anticorps.

Lorsque nous connaissons mieux le récepteur, lorsqu'il aura été isolé et que nous aurons déterminé la nature exacte de l'enzyme ou du système enzymatique impliqué dans la réponse aux catécholamines, alors nous n'aurons probablement plus besoin de parler de "récepteur". C'est pourquoi les définitions de ce terme sont toujours aussi générales. A date, nous savons que le système nerveux sympathique produit son effet en libérant une substance chimique, ADRENALINE, NORADRENALINE, à la terminaison nerveuse. Cette substance réagit avec le récepteur située dans les tissus et le résultat de l'interaction de ces deux molécules est la réponse biologique du tissu. Pour nous aider à établir une notion plus précise de ces récepteurs, il nous semble que la meilleure façon est d'agir sur eux avec des antagonistes i.e. des bloqueurs.

Malgré la simplification utilisée dans la classification (en récepteur de type α et β), nous devons reconnaître que les récepteurs de type α sont les mêmes partout. En effet, Furchgott (1959;1967) a démontré que tous les récepteurs adrénérgiques de type α sont de la même nature chimique parce qu'ils ont la même constante de dissociation et que l'action des catécholamines est toujours la même. Pour ce qui est des récepteurs du type β , Furchgott (1967) et Farmer et Levy (1970), les classifient en trois et même quatre groupes parce que leur constante de dissociation, l'activité des catécholamines et celle des bloqueurs varient selon les tissus et les animaux utilisés.

Nous savons que la relation entre les catécholamines et les récepteurs est extrêmement complexe et qu'un enzyme y est impliqué. Les hypothèses sur la nature de cet enzyme varient d'un auteur à l'autre. Pour les récepteurs du type α , Belleau (1967) a émis l'idée qu'il s'agit d'une ATPase à calcium mais n'exclue pas la possibilité que l'adényl cyclase préconisée par Robinson et Sutherland (1971) soit partie de ce récepteur.

Tous sont d'accord sur le fait que les catécholamines réagissent avec le récepteur pour agir ensuite sur l'enzyme. Ce dernier déclenchera alors, une réaction qui différera selon le type de cellules impliquées.

De récentes expériences faites par Novales (1971) semblent confirmer que chez les mélanophores du Fundulus heteroclitus, l'adényl cyclase fait partie de ce mécanisme. En effet, l'utilisation de PHENTOLAMINE, un bloqueur adrénergique de type α , et de PROPRANOLOL, un bloqueur adrénergique de type β , a entraîné respectivement une diminution et une augmentation de l'AMP cyclique. En 1967, Novales et Davis avaient obtenu une dispersion des mélanophores d'un amphibien en injectant de l'AMP cyclique.

Pour ce qui est du récepteur β , la controverse sur l'enzyme impliqué n'existe pas et il est généralement admis que l'adényl cyclase fait partie de ce mécanisme. Pour Robinson et Sutherland (1971) par exemple, lorsque l'adrénaline arrive sur la partie externe de la membrane,

elle active un récepteur protidique qui stimule la formation de prostaglandines. Celles-ci agissent sur l'adényl cyclase, un enzyme qui transforme l'ATP en AMP cyclique. Les effets physiologiques au niveau cellulaire sont déclenchés par l'AMP cyclique. Rosen et Einstein (1970) ont d'ailleurs prouvé sur des érythrocytes de grenouilles, la stimulation de l'adényl cyclase par les catécholamines et son blocage par certains bloqueurs de type β .

L'étude de ces récepteurs se fait donc avec des produits bloquant sélectivement les récepteurs de type α et β et permettant d'observer la réponse de l'organisme ou du tissu après addition des catécholamines. A cause du manque de spécificité des bloqueurs et de la variété de leur mode d'action, il faut en utiliser plusieurs. L'écaille du Fundulus heteroclitus présente un milieu idéal et encore inexploité pour une étude de ce type. Une écaille de poisson est une entité presque complète qui se prête très bien au genre d'expériences entreprises dans le présent travail.

Relativement indépendante sur le plan physiologique, l'écaille possède des propriétés de résistance et de vitalité inouïes; elle peut être utilisée plusieurs heures dans une solution saline sans que sa réponse à divers stimuli ne soit perturbée. La technique est une des plus simples que l'on connaisse à date pour ce genre d'étude. En effet, le prélèvement d'une partie de l'aorte ou du duodénum d'un animal représente une technique extrêmement complexe, longue et occasionne beaucoup de traumatisme en plus d'isoler un tissu dont les interdépendances avec

le reste de l'animal, sont beaucoup plus complexes que celles qui existent entre l'écaille et le poisson. Il faut toutefois reconnaître que dans les deux cas, il y a rupture de la fibre nerveuse. Dans le cas précis de l'écaille, cette rupture laisse dans la fibre nerveuse une quantité plus ou moins grande d'adrénaline selon la manipulation et il faut en tenir compte lors de l'analyse des résultats.

Nous possédions déjà beaucoup de bloqueurs de type α . Ces bloqueurs étaient les uns, irréversibles et les autres, réversibles. Parmi les réversibles, AZAPETINE et PHENTOLAMINE, forment un azote quaternaire à faible potentiel énergétique (à cause de la résonnance). Dans le cas de ces bloqueurs, l'azote quaternaire établit avec le groupement COO- du récepteur α un lien qui peut être renversé par l'addition d'une dose compétitive de catécholamines.

Dans le groupe des irréversibles, la DIBENAMINE et la PHE-NOXYBENZAMINE forment une alkylation irréversible avec le récepteur mais il semble que le pH doit être au-dessus de 7. Ces bloqueurs ont l'avantage d'avoir une action qui dure très longtemps (Agarval et al 1956).

Plus récemment, une nouvelle classe de bloqueurs, celle des N-carbethoxyhydroquinolines dont fait partie le EEDQ a été découverte. Ce bloqueur n'a toutefois aucun des éléments capable d'en faire théoriquement un bloqueur de type α . Un nouveau modèle d'action fut proposé par Belleau et al. (1969) pour expliquer son action par la formation d'un lien peptidique

qui paralyse le récepteur dans deux de ses sites actifs, le site anionique et le site cationique. La confirmation de ce mode d'action fut faite par l'utilisation de EEDQ dans la synthèse des protéines (Bel-leau et Malek 1968).

Parmi les bloqueurs adrénérgiques du type β , une sélection plus rigoureuse fut nécessaire. Tous sont des bloqueurs compétitifs et il n'en existe aucun qui soit irréversible (Fitzgerald 1969). Leur mode d'action sur le récepteur β ressemble à celui de l'ISOPRENALINE. Etant donné le manque de données sur le type de récepteur des mélanophores du Fundulus heteroclitus, il était nécessaire de choisir ceux qui exercent une activité sur tous les récepteurs de type β sans sélectivité.

D'une façon générale, tous les bloqueurs de type β ont en commun:

- La forme L.
- La substitution N alkyl. (cfr. pa. 20)
- Le fait que l'augmentation de la distance entre le groupement aminé et le noyau aromatique augmente l'activité du bloqueur.
- Le fait qu'il est préférable de ne rien substituer sur le noyau aromatique parce qu'alors apparaît une activité intrinsèque sympathomimétique qui rend difficile l'utilisation de ces bloqueurs (D.C.I. par exemple).

qui paralyse le récepteur dans deux de ses sites actifs, le site anionique et le site cationique. La confirmation de ce mode d'action fut prouvée par l'utilisation de EEDQ dans la synthèse des protéines (Bel-leau et Malek 1968).

Parmi les bloqueurs adrénérgiques du type β , une sélection plus rigoureuse fut nécessaire. Tous sont des bloqueurs compétitifs et il n'en existe aucun qui soit irréversible (Fitzgerald 1969). Leur mode d'action sur le récepteur β ressemble à celui de l'ISOPRENALINE. Etant donné le manque de données sur le type de récepteur des mélanophores du Fundulus heteroclitus, il est nécessaire de choisir ceux qui exercent une activité sur tous les récepteurs de type β sans sélectivité.

D'une façon générale, tous les bloqueurs de type β ont en commun:

- La forme L.
- La substitution N alkyl.
- Le fait que l'augmentation de la distance entre le groupement aminé et le noyau aromatique augmente l'activité du bloqueur.
- Le fait qu'il est préférable de ne rien substituer sur le noyau aromatique parce qu'alors apparaît une activité intrinsèque sympathomimétique qui rend difficile l'utilisation de ces bloqueurs (D.C.I. par exemple).

L'idée d'associer à la notion de récepteur la possibilité d'expliquer le mécanisme du changement de couleur du Fundulus heteroclitus est venue du fait que le Fundulus change très rapidement de couleur pour s'adapter à son environnement. Cette modification de la couleur, qui lui permet surtout de se camoufler facilement, est due à un pigment noir, la mélanine contenue dans une inclusion cellulaire du mélanophore. Quand la mélanine est située à proximité du centre, ceci constitue ce qu'il est convenu d'appeler une agrégation ou une contraction et laisse une couleur blanche sur toute la surface de l'animal. Eloignée du centre, ou en état de dispersion, ceci donne alors au poisson une couleur noire.

Novales et Novales (1966) ont étudié au microscope électronique les mouvements de la mélanine sur le Fundulus heteroclitus et ont constaté une multitude d'états intermédiaires selon que la dispersion est plus ou moins poussée.

Des expériences faites sur le Fundulus et sur de nombreuses autres espèces démontrent que le changement de couleur de ces poissons peut être influencé par de nombreux autres facteurs que la couleur du milieu où il évolue. Ainsi, Doudoroff (1945) avec le Fundulus et l'Atherinops, et Abbott (1969) avec le Fundulus ont démontré l'influence de la température lors d'expériences in vitro

mais les modifications ne se sont produites qu'à des températures extrêmes. Iwata et al. (1959 a et b) démontrèrent que Carassius auratus subissait l'influence de cycles circadiens et répondait à la présence de certains ions. Pour Marsland et Meisner (1967), la pression exercée par le D₁ et la température, contribuait à la dispersion des mélanophores du Fundulus heteroclitus.

D'une façon générale, le changement de couleur d'un poisson peut être dû au système endocrinien ou au système nerveux. Chez certaines espèces, l'interaction des deux mécanismes permet l'adaptation du poisson à son milieu. Dans le cas du Fundulus heteroclitus, cette adaptation étant presque instantanée, plusieurs chercheurs soupçonnent la prédominance du système nerveux sur le système endocrinien dans ce processus physiologique comme le décrit la revue sur le sujet par Fujii et Novales (1969b), Healey et Ross (1966) avec le Phoxinus phoxinus L, Grove (1969 a et b) avec le Phoxinus phoxinus L et Abbott (1968) avec le Fundulus heteroclitus ont démontré l'adaptation presque immédiate de ces poissons sur fond blanc ou noir. Holmberg (1968) n'a pas obtenu ces résultats avec le Myxine glutinosa L.

Parker (1948) fut un des premiers à supposer que les fibres adrénergiques soient responsables de l'aggrégation et les fibres cholinergiques de la dispersion du mélanophore chez le Fundulus heteroclitus. Par la suite,

Watanabe et al. (1962) nièrent l'action des fibres cholinergiques comme facteur de dispersion. Scott (1965) sur le Scopthalmus aquosus, Healey et Ross (1966) chez le Phoxinus phoxinus L et Abbott (1968) chez le Fundulus hétéroclitus nièrent aussi l'effet dispersant des fibres cholinergiques, l'acétylcholine et les bloqueurs cholinergiques n'ayant aucun effet.

Devant l'incohérence des résultats sur ce mécanisme du changement de couleur des poissons, Jacobowitz et Laties (1968) tentèrent de démontrer, chez le téléostéen Tautogolabrus adspersus, le rôle du système nerveux adrénergique par une technique de fluorescence des catécholamines. Leur conclusion fut que le système nerveux adrénergique était responsable de l'agrégation mais ils ne purent prouver l'existence de fibres dispersantes. Ils énoncèrent l'hypothèse d'un système plus complexe que le système adrénaline-acétylcholine tel que proposé par Parker (1948) et que plusieurs autres chercheurs n'ont pu mettre en évidence.

Fujii et Novales (1969 a) ont tenté de mettre en évidence l'origine nerveuse de cette physiologie des chromatophores sur le Fundulus hétéroclitus. Ils démontrèrent l'influence nerveuse par des sections de fibres nerveuses sur l'animal. Par la suite, des stimulations

électriques ne donnant pas une réponse proportionnelle à différentes intensités, ils soupçonnèrent la présence de plus de deux fibres nerveuses contrôlant l'agrégation et la dispersion.

Goldman et Hadley (1969,1970) ont, à l'aide d'un bloqueur de type α , la DIBENAMINE, et d'un bloqueur de type β , le PROPRANOLOL, mis en évidence chez le lézard, Anolis carolinensis, des récepteurs β responsables de la dispersion de la mélanine et des récepteurs α , de son agrégation.

Grove (1969 a et b) reprit cette théorie chez le Phoxinus phoxinus L au cours d'expérience "in vivo". Il procéda à des sectionnements de fibres nerveuses pour finalement prouver que les fibres adrénergiques étaient responsables de l'agrégation dans cette espèce et cela, grâce aux récepteurs de type α . Il fut incapable de prouver le mécanisme de la dispersion. Abbott (1968) avait utilisé chez le Fundulus heteroclitus, des bloqueurs de type α et un bloqueur de type β , le PROPRANOLOL lors d'expériences in vitro et in vivo. Malheureusement, il n'avait pu confirmer cette dualité soupçonnée à l'intérieur du système nerveux adrénergique.

Cette étude a pour but de démontrer la présence de récepteurs adrénergiques de type α et β dans les mélanophores du Fundulus heteroclitus et si ce but premier est atteint, d'évaluer leurs rôles respectifs dans le mécanisme du changement de couleur du poisson.

Les expériences des autres auteurs ne mentionnent jamais les pH et des études de dosage sont rares. Nous avons donc décidé d'étudier ces deux aspects, en particulier les problèmes de solubilisation, de pénétration et de transformation en produit actif. Nous avons aussi tenté de vérifier s'il y avait une interaction entre les bloqueurs adrénergiques de type α et ceux de type β .

2.0 MATERIEL ET METHODE

2.1 MATERIEL

2.11 POISSONS

Quelques spécimens de Fundulus hétéroclitus, nous sont parvenus, au début, du laboratoire de biologie marine de Solomons au Maryland mais la plupart provenait de celui du Nouveau-Brunswick. Les poissons, mâles et femelles, de 2 à 7 centimètres étaient traités dès leur arrivée selon une méthode déjà décrite par Abbott et Schwartz (1968). Les Fundulus étaient ensuite maintenus à 15°C dans un aquarium de 425 litres contenant de l'eau de mer instantanée provenant de Eastlake en Ohio (Aquarium Systems Inc.,). Le poids spécifique de l'eau était de 1.025 et son pH, de 7.25.

2.12 DROGUES (et leur utilisation)

Les drogues utilisées sont de trois (3) types: les catécholamines, les bloqueurs adrénérgiques de type α

et de type β . Leur structure et leur provenance sont décrites dans le tableau No.1, d'après Goodman et Guilman (1970) et Grollman et Grollman (1970).

Nous avons procédé à deux (2) types d'expériences:

- 1) In vitro
- 2) In vivo .

Ces expériences avaient pour but de vérifier l'état d'agrégation ou de dispersion observé lors de l'addition du bloqueur et/ou des catécholamines.

1) Lors de l'expérience in vitro , nous procédions:

1. Au prélèvement de l'écaille;
2. A la préparation de l'écaille dans une solution saline;
3. A la lecture de l'état d'agrégation ou de dispersion des mélanophores selon l'Index des Mélanophores Moyens;
4. A l'addition du bloqueur et à la lecture des résultats;
5. A l'addition des catécholamines et à la lecture des résultats.

2) L'expérience in vivo est un peu différente; il fallait procéder:

1. A l'adaptation du poisson à la température de la pièce et à l'exiguité des béciers;
2. A la vérification du changement de couleur du poisson dans un milieu blanc et dans un milieu noir;
3. A l'injection des bloqueurs et des catécholamines pour vérifier leurs effets sur l'état d'agrégation ou de dispersion du poisson.

TABLEAU No.1 (a) - PRESENTATION DES DROGUES
UTILISEES AU COURS DE
CETTE RECHERCHE

CATECHOLAMINES

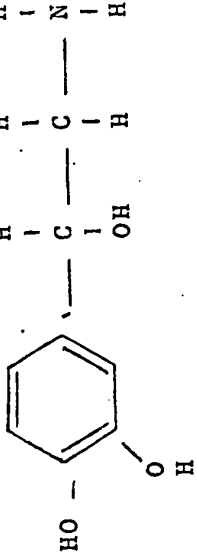
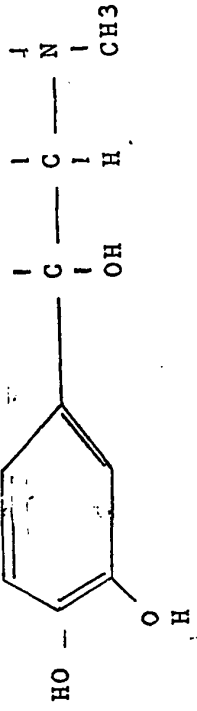
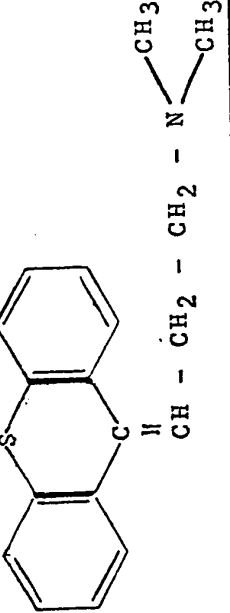
Nom générique (nom commercial) et fabriquant	Formule chimique
Noradrénaline (Levophed de Winthrop)	
Adrénaline (adrénaline de Matheson, Coleman et Bell)	
TRANQUILISANT A PROPRIETE DE BLOQUEUR DE TYPE α	
Chlorprothixène (Tarasan) (de Roche)	

TABLEAU No.1 (b) - PRESENTATION DES DROGUES
UTILISEES AU COURS DE
CETTE RECHERCHE

BLOQUEURS ADRENERGIQUES DE TYPE α

Nom générique (nom commercial)	Formule chimique
Dibenamine (Dibenamine de S.K.F.) no.199 G.D. 2819 iso no.133666	
Phenoxybenzamine (Dibenzylamine de S.K.F.) R.M. no.288 spec. 10407	
Azapetine (Ilidar de Roche) no.R.4953	
N éthoxy carbonyl 2 éthoxy 1-2 dihydroquinoline (EEDQ de Bristol)	
Phentolamine (Rogitine de Ciba) no.2/68	

* la formule et le nom générique proviennent de Martel et al.(1966) et Belleau et al.(1969) à cause de sa découverte récente.

TABEAU No.1 (c) - PRESENTATION DES DROGUES
BLOQUEURS ADRENERGIQUE DE TYPE B
 UTILISEES AU COURS
 DE CETTE RECHERCHE

Nom générique (nom commercial)	<u>Formule chimique</u>
Propranolol (Inderal de Ayerst) lot no.1841	$ \begin{array}{c} \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{NH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{CH} (\text{CH}_3)_2 \\ \text{C}_6\text{H}_4 \end{array} $
Oxprenolol (Trasacor de Ciba) 38,089 ba Mel 10/67	$ \begin{array}{c} \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{NH} - \text{CH} (\text{CH}_3)_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{O} \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} $
Prinodolol (L.B. 46 de Sandoz)	$ \begin{array}{c} \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{NH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{CH} (\text{CH}_3)_2 \\ \text{C}_6\text{H}_4 \end{array} $
Dichloroisoproterenol (D.C.I. de Aldrich)	$ \begin{array}{c} \text{CH} - \text{CH} - \text{NH} \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{CH} (\text{CH}_3)_2 \\ \text{C}_6\text{H}_2 \text{Cl}_2 \end{array} $

TABEAU No.2 (a): SOLUBILITE DES CATECHOLAMINES

CATECHOLAMINES	Solubilisation Soluble dans la solution saline (1) plus stable à pH 3.5
ADRENALINE	
NORADRENALINE	(1) plus stable à pH 3.5 Soluble dans la solution saline
Tranquillisant à propriété de bloqueur α CHLORPROTHIXENE	(2) soluble dans la solution saline acidifiée au moins au pH 3.5

(1) : D'après Goodman et Goldman (1970), l'index de Merck (1968) et Grollman et Grollman (1970).

(2) : D'après les indications du manufacturier.

TABLEAU No.2 (b): SOLUBILITE DES BLOQUEURS ADRENER-
GIQUES DE TYPE B

PROPRANOLOL 10 microgrammes 200 microgrammes	<u>Solubilisation</u> (1) très soluble dans la solution saline
OXPRENOLOL 30 microgrammes 300 microgrammes	(2) très soluble dans la solution saline
PRINODOLOL 200 microgrammes	(2) soluble dans la solu- tion saline à pH 3.5 et moins
DCI 250 microgrammes	(2) soluble dans la solu- tion saline

(1) : D'après Goodman et Goldman (1970), l'index de
Merck (1968) et Grollman et Grollman (1970).

(2) : D'après les indications du manufacturier.

TABEAU No.2 (c) : SOLUBILITE DES BLOQUEURS
ADRENERGIQUES DE TYPE α

DIBENAMINE	<u>Solubilisation</u>
100 microgrammes 200 microgrammes	(1) soluble dans la solution saline acidulée, peut être ramené à un pH de 7.2 par la suite
PHENOXYBENZAMINE 100 microgrammes	(1) soluble dans la solution saline acide à pH 5 et moins
AZAPETINE 5 microgrammes	(2) Soluble dans l'alcool à 95% puis ajouter la solution saline pour un volume de 5% d'alcool
EEDQ 25 microgrammes 100 microgrammes	(2) Soluble dans l'alcool à 95% puis ajouter la solution saline pour un volume de 5% d'alcool
PHENTOLAMINE 1 microgramme	(2) Soluble dans la solution saline (1 dans 100)

(1) D'après Goodman et Goldman (1970), l'index de Merck (1968) et Grollman et Grollman (1970)

(2) D'après les indications du manufacturier

2.2 METHODE

2.21 ETUDE IN VITRO

Vingt (20) poissons furent utilisés par expérience. Une écaille par sujet fut prélevée au moyen de forceps dans la région située autour de la nageoire dorsale de l'animal. Sur chaque écaille, les mêmes dix mélanophores, dans la même région d'une écaille à l'autre, étaient observés au microscope Leitz, dans une lame concave, au grossissement 3.5×10 .

Leur état était classé à la température de la pièce, selon l'Index des Mélanophores introduit par Hogben et Slome (1931), pour les amphibiens et appliqué aux téléostéens par Healey (1951). Il a été établi de un à cinq (1 à 5), un (1) étant l'agrégation maximum et cinq (5), la dispersion maximum. Les résultats étaient additionnés et divisés par dix (10) pour donner l'Index des Mélanophores Moyens (I.M.M.)

Dans cette série d'expériences, chaque écaille était soumise au traitement suivant:

1. Stabilisation pour vingt (20) minutes dans la solution saline;
2. Addition du bloqueur;
3. Vingt (20) minutes d'attente et de lectures;
4. Addition des catécholamines;
5. Quinze (15) minutes d'attente et de lectures.

La période de stabilisation de vingt (20) minutes se faisait dans 0.066 ml (1 goutte) de solution saline composée de:

1. Vingt (20) parties de NaCl 0.1N
2. Une (1) partie de CaCl_2 0.1N
3. Une (1) partie de KCl 0.1N

Cette solution avait été établie par Spaeth et Barbour (1917). Les lectures étaient prises aux cinq (5) minutes pour vingt (20) minutes; les trois (3) dernières lectures donnant presque toujours un résultat identique.

Pour l'étape suivante, 0.066 ml (1 goutte) de bloqueur était ajoutée à l'écaille et les lectures étaient prises aux cinq (5) minutes pour vingt (20) minutes.

Le bloqueur était solubilisé dans la solution saline selon ses propriétés; celles-ci sont décrites dans le tableau No.2. Lorsque c'était possible, une expérience était faite avec la solution de bloqueur ajusté au pH 7.2 (pH physiologique du plasma du poisson) (Bowman et Davidson, 1956). La solution était toujours utilisée rapidement (jamais plus d'une heure) après sa préparation.

Le problème général des bloqueurs, des combinaisons de concentrations et de pH, était pour nous d'un intérêt majeur. A chaque fois qu'il l'a été possible, nous avons multiplié les expériences en variant les pH et les dosages. Nous étions, dans certains cas, limités par la solubilité de la drogue.

Les doses de bloqueur que nous mentionnerons correspondent à la dose totale administrée à chaque écaille. Lorsqu'un pH différent était choisi ou nécessaire pour permettre la solubilisation du bloqueur, la solution était ajustée avec l'acide acétique glacial ou le NaOH 0.1N.

Chaque fois qu'une solution différente de la solution saline standard était nécessaire pour la solubilisation ou la stabilisation d'un bloqueur quelconque, cette solution modifiée était utilisée avec vingt (20) écaillés qui servaient de témoins sans l'addition du bloqueur. L'usage des catécholamines restait toujours le même.

Pour finir, l'écaillé était rincée avec la solution saline et ensuite placée dans la lame avec une solution d'adrénaline ou de noradrénaline. Les doses utilisées étaient constantes: cinquante (50) microgrammes de valeur de base. Les lectures étaient prises aux cinq (5) minutes pour quinze (15) minutes. L'adrénaline et la noradrénaline étaient préalablement solubilisées dans la solution saline et acidifiées au HCl à un pH de 3.5 pour en augmenter la stabilité.

Toutes les matières sèches étaient pesées sur une balance Sartorius du type "2444" qui donnait une précision de quatre (4) décimales".

Une dernière série d'expériences fut faite avec les bloqueurs adrénergiques de type α et β . La DIBENAMINE et l'OXPRENOLOL furent utilisés consécutivement.

Dans ce cas, l'écaille une fois prélevée, était soumise au traitement suivant:

1. Stabilisation pour vingt (20) minutes;
2. Addition de DIBENAMINE;
3. Vingt (20) minutes d'attente et de lectures aux cinq (5) minutes;
4. Addition d'OXPRENOLOL;
5. Vingt (20) minutes d'attente avec lectures aux cinq (5) minutes;
6. Addition de NORADRENALINE;
7. Quinze (15) minutes d'attente et de lectures aux cinq (5) minutes.

2.22 ETUDE IN VIVO

La préparation des sujets qui devaient subir l'expérience in vivo, aux conditions expérimentales se fit en deux temps. Un transfert de quelques jours (entre 2 et 4 jours), dans des aquariums de plastique de polyéthylène (Rosedale Plastic, Lindsay, Ont.,) de 110 litres contenant l'eau de mer à la température de la pièce. Un transfert, une demi-heure avant l'expérience, des poissons par groupe de quatre (4) dans des aquariums de 7 litres.

Au moment de l'expérience, chaque poisson était placé dans un bécher de 1000 ml contenant 600 ml d'eau salée. Chaque bécher était alors complètement engainé d'un cylindre de carton noir ou blanc.

Le but de cette opération était de vérifier la capacité du poisson de changer sa couleur du noir au blanc ou vice-versa.

Après cette vérification, chaque poisson était soumis au traitement suivant:

- 1- Détermination de l'Index d'Ostwald initial;
- 2- Injection du bloqueur;
- 3- Trente (30) minutes d'attente et de lectures sur fond noir et sur fond blanc;
- 4- Injection des catécholamines;
- 5- Quinze (15) minutes d'attente et de lectures.

L'injection du bloqueur α et β était faite I.P. Afin d'éviter toute perte, la dose était toujours dissoute dans un volume ne dépassant pas 0.1 ml.

Les lectures étaient enregistrées selon l'Index d'Ostwald modifiée (Abbott et Schwartz 1968) (variant de 0 à 8) légèrement modifiée. Chaque papier utilisé dans cette méthode était glissé sous le bécher pour déterminer celui qui s'approchait le plus de la couleur du poisson.

A chaque expérience, nous avons utilisé huit (8) poissons. De ces huit (8) sujets, quatre (4) étaient ensuite placés sur fond noir et les quatre (4) autres, sur fond blanc. Nous injectons ensuite, ces huit (8) poissons avec le bloqueur. Pendant trente (30) minutes, les lectures étaient faites. En attendant le temps nécessaire pour la réaction avec le récepteur, nous pouvions évaluer l'effet de la drogue seule. Deux moyennes des quatre (4) Index d'Ostwald

2.22 ETUDE "IN VIVO"

La préparation des sujets qui devaient subir l'expérience in vivo, aux conditions expérimentales se fit en deux temps. Un transfert de quelques jours (entre 2 et 4 jours), dans des aquariums de plastique de polyéthylène (Rosedale Plastic, Lindsay, Ont.,) de 110 litres contenant l'eau de mer à la température de la pièce. Un transfert, une demi-heure avant l'expérience, des poissons par groupe de quatre (4) dans des aquariums de 7 litres.

Au moment de l'expérience, chaque poisson était placé dans un bécher de 1000 ml contenant 600 ml d'eau salée. Chaque bécher était alors complètement engainé d'un cylindre de carton noir ou blanc.

Le but de cette opération était de vérifier la capacité du poisson de changer sa couleur du noir au blanc ou vice-versa.

Après cette vérification, chaque poisson était soumis au traitement suivant:

- 1- Détermination de l'index d'Ostwald initial;
- 2- Injection du bloqueur;
- 3- Trente (30) minutes d'attente et de lectures sur fond noir et sur fond blanc;
- 4- Injection des catécholamines;
- 5- Quinze (15) minutes d'attente et de lectures.

L'injection du bloqueur α et β était faite I.P. Afin d'éviter toute perte, la dose était toujours dissoute dans un volume ne dépassant pas 0.1 ml.

Les lectures étaient enregistrées selon l'index d'Ostwald modifiée (Abbott 1968) (variant de 0 à 8) légèrement modifié. Chaque papier utilisé dans cette méthode était glissé sous le bécher pour déterminer celui qui s'approchait le plus de la couleur du poisson.

A chaque expérience, nous avons utilisé huit (8) poissons. De ces huit (8) sujets, quatre (4) étaient ensuite placés sur fond noir et les quatre (4) autres, sur fond blanc. Nous injectons ensuite, ces huit (8) poissons avec le bloqueur. Pendant trente (30) minutes, les lectures étaient faites. En attendant le temps nécessaire pour la réaction avec le récepteur, nous pouvions évaluer l'effet de la drogue seule. Deux moyennes des quatre (4) index d'Ostwald

étaient faites dans chaque cas.

Nous procédions ensuite à l'injection I.P. d'adrénaline ou de noradrénaline, 50 µgm, (valeur de base). La capacité d'adaptation du poisson sur fond noir et sur fond blanc était vérifiée dans chaque cas. La vérification des lectures sur papier d'Ostwald était faite par comparaison sur deux (2) poissons témoins dont l'un, était constamment sur fond blanc et l'autre sur fond noir. Ces deux (2) témoins ne recevaient que des injections salines. En tout, l'expérience durait environ une (1) heure.

3.0 RESULTATS

3.0 RESULTATS DE L'ETUDE IN VITRO

Les buts des expériences faites au cours de ces recherches étaient les suivants:

- a) Evaluer l'effet des variations de plusieurs pH (3.5, 5.0, 6.1 et 7.2), sur l'état d'agrégation ou de dispersion de l'écaille.
- b) Vérifier l'effet d'un blocage sur la réponse des mélanophores aux catécholamines. L'effet de deux types de bloqueurs était étudié: les bloqueurs de type α et de type β .
- c) Contrôler l'affinité de chacun des récepteurs de type α et β pour l'ADRENALINE et la NORADRENALINE. C'est pourquoi, nous avons fait, pour chaque bloqueur, deux séries d'expériences utilisant dans un cas, l'ADRENALINE et dans l'autre cas, la NORADRENALINE.

3.0 RESULTATS DE L'ETUDE IN VITRO

Les buts des expériences faites au cours de ces recherches étaient les suivantes:

- a) Evaluer l'effet des variations de plusieurs pH (3.5, 5.0, 6.1 et 7.2), sur l'état d'agrégation ou de dispersion de l'écaille.
- b) Vérifier l'effet d'un blocage sur la réponse des mélanophores aux catécholamines. L'effet de deux types de bloqueurs était étudié: les bloqueurs de type α et de type β .
- c) Contrôler l'affinité de chacun des récepteurs de type α et β pour l'ADRENALINE et la NORADRENALINE. C'est pourquoi, nous avons fait, pour chaque bloqueur, deux séries d'expériences utilisant dans un cas, l'ADRENALINE et dans l'autre cas, la NORADRENALINE.

3.1 TRAITEMENT DES DONNEES.

Les données brutes sont consignées au département de biologie de l'Université Sir George Williams. Pour clarifier l'explication, deux (2) tableaux ont été insérés au texte (tableaux 3 et 4). Chaque chiffre du tableau correspond à la moyenne des lectures obtenues sur chacun des 10 mélanophores observés sur chacune des vingt (20) écailles.

Etant donné que chacune de nos expériences fut faite en trois étapes successives, nous établîmes à partir de ces données brutes, trois moyennes des lectures dans l'ordre suivant:

- 1) A la fin de la période de stabilisation;
- 2) Après l'addition des bloqueurs (ou de solutions physiologique dans le cas des témoins);
- 3) Après l'addition des catécholamines.

L'analyse de variance fut établie pour chaque expérience entre:

- a) Les moyennes obtenues à la fin de la stabilisation et celles obtenues après addition des bloqueurs (i.e. effet des bloqueurs per se ou \bar{d}_1);
- b) Les moyennes obtenues après l'addition des bloqueurs et celle de l'addition des catécholamines (i.e. effet des bloqueurs sur la réponse aux catécholamines ou \bar{d}_2).

Ce sont ces différences que nous retrouvons dans les différents tableaux qui font partie de ce texte.

Considérons par exemple, le tableau No.3 : il représente l'action de la DIBENAMINE 200 microgrammes à un pH de 7.2 suivi de l'ADRENALINE 50 microgrammes,

Chacun des chiffres inscrits dans ce tableau représente la moyenne des 10 mélanophores. Le tableau donne ces résultats pour chacune des 20 écailles et cela durant les phases de stabilisation, d'addition du bloqueur et l'addition des catécholamines. Observons l'écaille No. 2, à la fin de la période de stabilisation, sa valeur est de 2.0. A la fin de la période de l'addition du bloqueur, elle est de 3.0. Nous avons donc une différence de +1.0. Plutôt que de travailler avec les moyennes, nous nous sommes servis des totaux en multipliant ces moyennes par le nombre de mélanophores pour donner +10.0. Cette utilisation des totaux permet aussi de rendre plus évidente, la moindre variation de l'I.M.M.

Une différence semblable était établie à la fin de la période d'addition du bloqueur (3.0) et celle de l'addition de l'ADRENALINE (3.6). Nous obtenons alors une valeur totale de +6.0. Cette valeur positive représente une dispersion des mélanophores de cette écaille.

Le tableau No. 6, (représente ces mêmes valeurs mais pour les moyennes des totaux établies avec les 20 écailles et pour chacune des expériences faites par les bloqueurs de type α). Dans le cas de la DIBENAMINE,

TABEAU No.4:
RESULTATS OBTENUS APRES LE
TRAITEMENT DES ECAILLES DU FUNDULUS HETEROCLITUS
AVEC UNE SOLUTION PHYSIOLOGIQUE A PH 3.5 SUIVI
D'ADRENALINE (exprimée en I.M.M.)

Ecailles #

temps

Stabilization

† Sol. physio.

ADRENALINE

nous avons un résultat différent de celui des témoins, l'addition des catécholamines produisant toujours une agrégation (valeur négative sur l'I.M.M.), à moins qu'un bloqueur n'empêche son action sur le récepteur.

Ainsi, dans le tableau No.4, où des témoins ont été soumis à l'action d'une solution physiologique à pH 3.5 suivi d'ADRENALINE 50 microgrammes, l'échelle no.1 a donné une différence dans les moyennes entre la période de stabilisation (3.0) et celle de l'addition de la solution physiologique (3.0) de 0.0. Cependant, la différence entre la fin de la période d'addition de la solution physiologique (3.0) et celle de l'addition de l'ADRENALINE (1.2) a été de -1.8 (i.e. -18.0, total) donc une très forte agrégation.

On comprend donc que l'utilisation des bloqueurs de type β est plus complexe que celle des bloqueurs de type α et que leurs résultats pour être valables, doivent être comparés à ceux des témoins au même pH pour vérifier si le bloqueur a eu un effet sur la réponse aux catécholamines.

Nous avons choisi cette façon d'utiliser les analyses de variances afin de contourner le problème causé par le fait que certains bloqueurs modifiaient l'état d'agrégation ou de dispersion de l'échelle. En utilisant

les différences seulement, nous pouvons aussi éliminer les autres variations comme celles causées par la lumière, les cycles circadiens, etc.

Habituellement, à la fin de la période de stabilisation, les valeurs de l'I.M.M. variaient entre 2.5 et 3.0 ou 3.5 au maximum. Cette valeur de l'I.M.M. est très importante et si elle varie trop d'un sujet à l'autre (par exemple, de 1 à 4) nous devons être plus prudent dans l'interprétation des résultats. Si notre hypothèse des deux récepteurs se confirme, les récepteurs de type α seraient les médiateurs de la réponse d'agrégation des mélanophores du poisson et ceux de type β de leur dispersion. Cependant, si le bloqueur a un effet, cet effet se répercute automatiquement sur la réponse aux catécholamines puisque la moyenne établie est calculée entre la fin de la période ou le bloqueur est ajouté et celle où les catécholamines le sont. Si notre I.M.M. à la fin de la période de stabilisation n'est pas entre 2.5 et 3.0 ou 3.5, il y a risque dans certains cas de minimiser ou d'exagérer l'ampleur de certains résultats.

Ainsi, si les mélanophores sont très contractés et que nous attendons une dispersion, celle-ci sera plus facile à voir que si l'I.M.M. est déjà très dispersé avant l'addition des catécholamines,

Supposons par exemple que nous attendions une dispersion des mélanophores après l'addition d'ADRENALINE parce que nous avons utilisé un bloqueur de type α . Si l'écaille se stabilise à 3.5 et que l'addition du bloqueur change l'I.M.M. à la fin de sa période à 3.9, alors l'addition des catécholamines ne pourra produire qu'une dispersion à peine perceptible dont la signification reste difficile à établir à cause de la faible étendue de l'I.M.M. en question. Par contre, si l'écaille se stabilise à 1.5 et qu'à la fin de la période d'addition du bloqueur, elle atteigne 1.8, alors la dispersion produite par l'ADRENALINE paraîtra exagérée à cause de la grande marge qu'il reste à parcourir pour atteindre l'extrémité de l'I.M.M. qui est théoriquement de 5. Les mêmes explications sont applicables à l'étude de l'action des bloqueurs de type β .

Pour éviter toute opération qui aurait pu guider dans un sens quelconque les résultats que nous obtenions, nous avons prélevé, au hasard, les écailles à étudier sans tenir compte de leur état préalable d'agrégation ou de dispersion.

En effet, l'utilisation d'un groupe d'écailles dont tous les mélanophores étaient dispersés nous aurait

donné, avec un bloqueur α suivi d'ADRENALINE, une dispersion imperceptible. Une pareille dispersion nous aurait fait conclure fautivement ou hâtivement que ce bloqueur était sans action. Par contre, ce même groupe d'écaillés avec un bloqueur de type β suivi d'ADRENALINE nous aurait donné une agrégation trop significative. L'inverse nous aurait donné des résultats tout aussi décevants.

Cette façon de procéder s'avéra heureuse car nous avons obtenu dans presque tous les cas, une valeur de l'I.M.M. qui est entre 2.5 et 3 très rarement 3.5.

3.2 LES pH

Nous avons fait plusieurs expériences avec les pH de 3.5, 5.0, 6.1 et 7.2 pour voir si le pH seul pouvait être responsable de l'agrégation ou de la dispersion des mélanophores. Ces expériences serviront de témoins pour chacun des bloqueurs utilisés à l'un de ces pH.

Nous avons constaté que l'addition de la solution physiologique à l'un ou l'autre de ces pH, ne causait pas de variation dans les lectures de l'I.M.M. La réponse des mélanophores aux catécholamines n'était pas

modifiée, l'agrégation étant comparable dans tous les cas (voir les moyennes du tableau No.5). Le pH seul, n'est donc pas important dans le mécanisme de changement de couleur du poisson. Il nous fallait savoir si le même bloqueur utilisé à différents pH, pouvait donner des résultats différents. C'est ce que nous avons fait avec la DIBENAMINE. Le graphique No.1 montre que la réponse aux catécholamines est dépendante du pH. Nous pensons donc que le pH est extrêmement important, soit dans la transformation de la drogue en produit actif, soit dans pénétration vers le récepteur.

3.3 ETUDE DES RESULTATS DES BLOQUEURS DE TYPE α

Parmi les bloqueurs de type α , nous avons choisi quelques drogues appartenant au groupe des bloqueurs irréversibles et réversibles. Comme nous ne savions pas si les récepteurs adrénergiques des mélanophores du Fundulus hétéroclitus réagissaient comme ceux des mammifères, nous avons voulu choisir, parmi plusieurs groupes pharmacologiques de bloqueurs, quelques drogues susceptibles de réagir dans cette étude pour augmenter nos chances de réussite.

Le tableau No.6, sur les bloqueurs de type α démontre l'action individuelle des différentes drogues, celui du tableau No.7, résume notre interprétation statistique.

TABLEAU No.5: EFFETS DU PH SUR LA REPONSE AUX
CATECHOLAMINES DES ECAILLES DU
POISSON FUNDULUS HETEROCLITUS IN VITRO

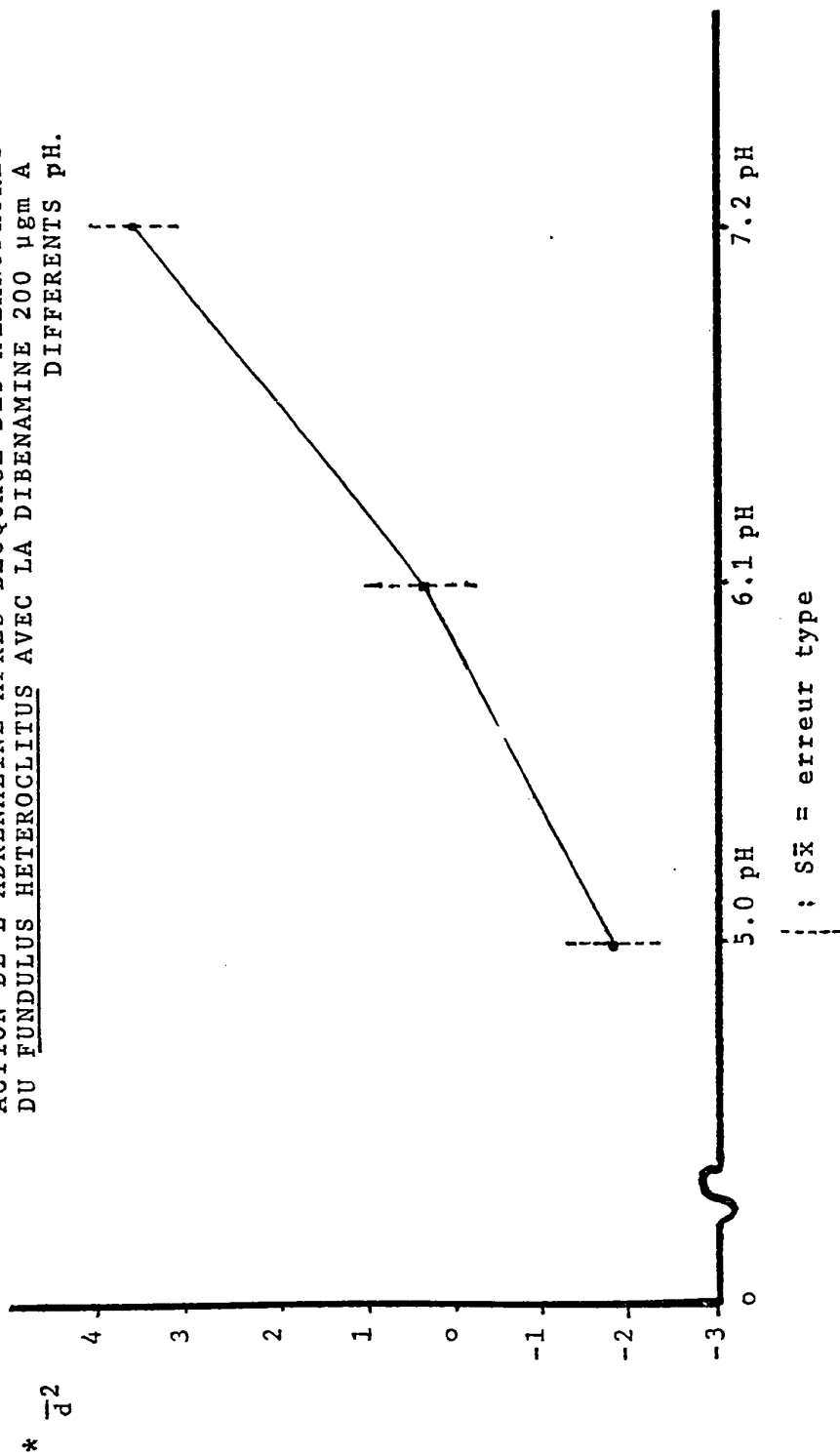
	pH 3.5		pH 5.0		pH 6.1		pH 7.2	
	*1	*2	*1	*2	*1	*2	*1	*2
\bar{d}_1	0.0	-1.0	+3.0	-1.0	+5.0	+16.0	+2.0	+5.0
\bar{d}_2	-12.2	-13.8	-13.85	-12.0	-11.2	-12.35	-16.2	-12.8

Effet
des
Catecho-
lamine
des pH

- * 1: Ecailles qui seront ou qui sont soumises à l'action de l'ADRENALINE
- * 2: Ecailles qui seront ou qui sont soumises à l'action de la NORADRENALINE
- \bar{d}_1 : Différence entre les moyennes de 1'I.M.M. à la fin de la période de stabilisation et celle de l'addition de la solution physiologique.
- \bar{d}_2 : Différence entre les moyennes de 1'I.M.M. à la fin de la période de l'addition de la solution physiologique et celle de l'addition des catécholamines.

GRAPHIQUE No.1

ACTION DE L'ADRENALINE APRES BLOQUAGE DES MELANOPHORES
DU FUNDULUS HETEROCLITUS AVEC LA DIBENAMINE 200 µgm A
DIFFERENTS pH.



* \bar{d}^2 : différence entre les moyennes de l'I.M.M. à la fin de la période de l'addition de la DIBENAMINE et celle de l'addition de l'ADRENALINE.

**TABLEAU No.6: EFFETS DES BLOQUEURS DE
TYPE α SUR LA REPONSE AUX
CATECHOLAMINES DES ECAILLES
DU FUNDULUS HETEROCLITUS IN VITRO**

DROGUES et quantité en microgramme		Variation de l'I.M.M. après addition du bloqueur \bar{d}_1	Variation de l'I.M.M. entre les bloqueurs et les catécholamines. \bar{d}_2	
			ADRENALINE	NORADRENALINE
PHENTOLAMINE (pH 5)	1	+ 9.70	-14.20	
	2	+10.15		-12.10
EEDQ 100(pH 7.2)	1	- 0.03	0	
	2	X		X
25 (pH 7.2)	1	+14.60	+ 4.85	
	2	+ 5.85		+ 4.80
AZAPETINE 5 (pH 5)	1	+ 0.95	-11.10	
	2	- 0.70		- 7.10
PHENOXYBENZA- MINE 100(pH 7.2)	1	+ 4.90	+ 1.35	
	2	+ 6.20		- 0.70
DIBENAMINE 200(pH 7.2)	1	+ 8.80	+ 3.90	
	2	+ 6.35		+ 3.10
200(pH 6.1)	1	+ 2.15	- 0.25	
	2	X		X
200(pH 5.0)	1	+ 5.90	- 1.90	
	2	X		X
100(pH 7.2)	1	+ 7.30	- 8.05	
	2	X		X
CHLORPROTHIXE- NE 100 (pH3.5)	1	+ 0.55	+ 0.55	
	2	+ 0.40		- 0.15

X : expérience non faite

TABLEAU No.7 : REACTION DES MELANOPHORES A L'ACTION DES BLOQUEURS DE TYPE α COMPAREE A CELLE DES TEMOINS. INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS IN VITRO

DROGUES et quantité en micro- gramme		Bloqueur seul	Après addition		Différence entre A et NA
			A	NA	
PHENTOLAMINE (pH 5)	1	S (D)	NS		NS
	2	S (D)		NS	
EEDQ 100(pH 7.2)	1	NS	S (B)		
	2	X		X	
25(pH 7.2)	1	S (D)	S (D)		A>NA'
	2	S (D)		S (D)	
AZAPETINE 5(pH 5)	1	NS	NS		A>NA
	2	NS		S (D)	
PHENOXYBENZA- MINE 100(pH 5)	1	S (D)	S (B)		NS
	2	S (D)		S (B)	
DIBENAMINE 200(pH 7.2)	1	S (D)	S (D)		NS
	2	S (D)		S (D)	
200 (pH 6.1)	1	NS	S (B)		X
	2	X		X	
200 (pH 5.0)	1	S (D)	S (B)		X
	2	X		X	
100 (pH 7.2)	1	S (D)	S (D)		X
	2	X		X	
CHLORPROTHI- XENE 100 (pH 3.5)	1	NS	S (B)		NS
	2	NS		S (B)	

A : agrégation

D : dispersion

B : blocage sans A ni D.

S : significatif à $P < 0.05$

NS : différence non significative

X : expérience non faite

3.31 LES BLOQUEURS REVERSIBLES

Ces bloqueurs peuvent être renversés par une dose compétitive de catécholamines parce qu'ils ne forment pas avec le récepteur de liens stables et irréversibles.

PHENTOLAMINE (un microgramme à pH 5.0) a produit une dispersion très forte et comparable lors des deux expériences (\bar{d}_1 : +9.70 et +10.15). Nous avons attribué cette dispersion à un blocage α et conséquemment au lien des catécholamines endogènes avec le récepteur de type β . En effet, si le récepteur de type α est bloqué par la PHENTOLAMINE, les catécholamines endogènes ne peuvent se combiner qu'avec le récepteur de type β et produire ainsi la dispersion observée. L'addition des catécholamines a produit une agrégation, la \bar{d}_2 étant respectivement de -14.2 pour l'ADRENALINE et de -12.1 pour la NORADRENALINE, nous avons donc un résultat comparable à la réaction des témoins aux mêmes pH. De plus, il n'y a pas de différence significative entre l'action de l'ADRENALINE et celle de la NORADRENALINE. Le bloqueur semble avoir été renversé par la dose trop forte des catécholamines exogènes (50 microgrammes de valeur de base).

Une dose de 5 microgrammes d'AZAPETINE utilisée seule à pH 5.0 n'a produite aucune variation dans les lectures (\bar{d}_1 : + 0.95 et - 0.70). Seule l'addition de la NORADRENALINE a donné une réponse statistiquement significative, celle de l'ADRENALINE produisant une agrégation comparable aux témoins. Nous pensons donc, en considérant la forte dose utilisée et la faible variation de l'index, que l'ADRENALINE a été plus puissante que la NORADRENALINE d'où l'agrégation maximale constatée avec l'ADRENALINE ce qui l'a rendue comparable aux témoins.

CHLORPROTHIXENE 100 microgrammes, un tranquillisant à propriété de bloqueur α n'a produit aucun effet lorsqu'utilisé seul. Son utilisation n'a pas produit plus de variations sur l'I.M.M. que l'addition de la solution physiologique au même pH chez les témoins. Ce blocage pourrait être celui des deux types de récepteurs puisque nous n'avons obtenu ni agrégation ni dispersion. Il se peut aussi qu'il s'agisse d'une perturbation de la membrane, perturbant ainsi le transport à travers la membrane. Peut être le pH très acide de 3.5 est-il responsable de ce blocage? A cause de la faible solubilité du produit, il a été impossible de vérifier cette hypothèse.

Une dose de 5 microgrammes d'AZAPETINE utilisée seule à pH 5.0 n'a produite aucune variation dans les lectures (\bar{d}_1 : + 0.95 et -0.70). Seule l'addition de la NORADRENALINE a donné une réponse statistiquement significative, celle de l'ADRENALINE produisant une agrégation comparable aux témoins. Nous pensons donc, en considérant la forte dose utilisée et la faible variation de l'index, que l'ADRENALINE a été plus puissante que la NORADRENALINE d'où l'agrégation maximale constatée avec l'ADRENALINE ce qui l'a rendue comparable aux témoins. L'index ne variant que de un à cinq, il est difficile d'obtenir une agrégation plus forte que celle obtenue chez les témoins.

CHLORPROTHIXENE 100 microgrammes, un tranquillisant à propriété de bloqueur α n'a produit aucun effet lorsqu'utilisé seul. Son utilisation n'a pas produit plus de variations sur l'I.M.M. que l'addition de la solution physiologique au même pH chez les témoins. Ce blocage pourrait être celui des deux types de récepteurs puisque nous n'avons obtenu ni agrégation ni dispersion. Il se peut aussi qu'il s'agisse d'une perturbation de la membrane, perturbant ainsi le transport à travers la membrane. Peut être le pH très acide de 3.5 est-il responsable de ce blocage ? A cause de la faible solubilité du produit, il a été impossible de vérifier cette hypothèse.

3.32 LES BLOQUEURS IRREVERSIBLES

EEDQ, à un pH de 7.2 et avec 100 microgrammes, a été sans effet lorsqu'utilisé seul. Il a produit un blocage complet lors de l'addition de l'ADRENALINE empêchant ainsi l'agrégation des mélanophores. Avec 25 microgrammes, et aux mêmes pH, EEDQ a produit une très belle dispersion. Toutefois, la différence entre la dispersion produite lors des deux expériences est très grande (\bar{d}_1 : +14.60 et +5.85). En regardant les données brutes, on s'aperçoit que la variation de l'I.M.M. pour l'expérience qui sera suivie de NORADRENALINE reste dans les mêmes normes que celles des autres expériences (i.e. 2.5 et 3.0 ou 3.5 au maximum) tandis que celles suivies d'ADRENALINE sont situées entre 1.5 et 2.0 à la fin de la stabilisation. Ces phénomènes sont attribuables aux variations quotidiennes rencontrées lors de cette étude. Enfin, avec une telle différence à la fin de la stabilisation entre les deux groupes, le EEDQ de l'expérience No.1 (I.M.M. de 1.5-2.0) pouvait donc théoriquement disperser plus que celui de l'expérience No.2 (I.M.M. 2.5, 3.0 ou 3.5). Lors de l'addition des catécholamines, les résultats sont les mêmes dans les cas d'ADRENALINE et de NORADRENALINE i.e. +4.85 et +4.80. Nous avons donc une dispersion statistiquement significative si on la compare aux témoins soumis

aux mêmes pH. De plus, l'ADRENALINE est plus active que la NORADRENALINE dans ce cas, étant donné la possibilité plus grande d'agrégation du groupe No.1 (\bar{d}_1 : +14.60) par rapport au groupe No.2 (\bar{d}_1 : +5.85) et parce que l'addition de l'ADRENALINE et de la NORADRENALINE ont conduit à peu près aux mêmes résultats.

La DIBENAMINE a produit une dispersion significative à tous les pH utilisés sauf à pH 6.1 où il est à la limite de la signification et cela aux doses de 100 et 200 microgrammes. L'addition des catécholamines a été d'un grand intérêt puisque statistiquement, le seul à produire une dispersion a été le 100 microgrammes (\bar{d}_2 :-8.05) et le 200 microgrammes (\bar{d}_2 : +3.90 et +3.10) à pH 7.2; la dispersion étant plus forte avec 200 microgrammes qu'avec 100 microgrammes. A tous les autres pH utilisés, la réponse aux catécholamines a été proportionnelle aux pH utilisés (voir graphique No.1).

La PHENOXYBENZAMINE a produit une dispersion dans les deux séries d'expériences. L'addition des catécholamines a démontré un blocage complet qui s'est manifesté par le maintien de l'état des mélanophores comme le démontre l'absence de différence dans les lectures.

3.4 ETUDES DES RESULTATS DES BLOQUEURS DE TYPE β

Considérons maintenant les résultats obtenus lors de l'étude des bloqueurs de type β (tableaux No.8 et No.9).

Le PROPRANOLOL 200 microgrammes à pH 7.2, utilisé seul n'a donné aucun résultat significatif, son activité étant comparable à celle des témoins. Cependant, l'addition de NORADRENALINE, après le blocage, témoigne d'une action possible sur les récepteurs. Avec 10 microgrammes, à un pH de 7.2 une seule expérience donne une dispersion (\bar{d}_1 : -7.65) si on la compare aux témoins décelant ainsi la possibilité d'un blocage de quelques récepteurs β et du lien des catécholamines endogènes avec le récepteur α . L'addition des catécholamines n'a été significative qu'avec le groupe traité à l'ADRENALINE ce qui est compréhensible puisque le groupe soumis à l'action de la NORADRENALINE présentait une aggrégation déjà très avancée. Considérant l'état des mélanophores après la stabilisation et les variations entre les I.M.M. des données brutes, nous n'avons pas trouvé de différence entre l'action de l'ADRENALINE et celle de la NORADRENALINE.

TABLEAU No.8: EFFETS DES BLOQUEURS DE TYPE β SUR LA REPONSE AUX CATECHOLAMINES DES ECAILLES DU FUN-DULUS HETEROCLITUS IN VITRO

DROGUES et quantité en microgramme		Variation de l'I.M.M. après addition du bloqueur \bar{d}_1	Variation de l'I.M.M. entre les bloqueurs et les catécholamines \bar{d}_2	
			ADRENALINE	NORADRENALINE
PROPRANOLOL 10 (pH 7.2)	1	-0.85	-6.50	
	2	-7.65		-13.20
200 (pH 7.2)	1	X	X	
	2	0.00		- 0.10
DC1 250 (pH 6.1)	1	X	X	
	2	-3.80		- 0.20
250 (pH 7.2)	1	-0.75	-1.50	
	2	+0.25		+ 2.40
OXPRENOLOL 30 (pH 7.2)	1	+3.20	-14.30	
	2	+2.20		-13.90
300 (pH 7.2)	1	+2.90	-6.15	
	2	+8.05		-15.10
PRINODOLOL 200 (pH 3.5)	1	+0.25	-1.01	
	2	+1.20		- 1.60

TABLEAU No.9: REACTION DES MELANOPHORES A
L'ACTION DES BLOQUEURS DU
TYPE β COMPAREE A CELLE DES
TEMOINS. INTERPRETATION STA-
TISTIQUE DES RESULTATS IN
VITRO .

DROGUES		Bloqueur seul	Après addition		Différence entre A et NA
			A	NA	
PROPRANOLOL 10 (pH 7.2)	1	NS	S(A)		NS
	2	S(A)		NS	
200 (pH 7.2)	1	X	X		X
	2	NS		S(B)	
DC1 250 (pH 6.1)	1	X	X		X
	2	S(A)		S(B)	
250 (pH 7.2)	1	NS	S(B)		NS
	2	NS		S(B)	
OXPRENOLOL 30 (pH 7.2)	1	NS	NS		NS
	2	NS		NS	
300 (pH 7.2)	1	NS	S(D)		NA>A
	2	S(D)		NS	
PRINODOLOL 200 (pH 3.5)	1	NS	S(B)		NS
	2	NS		S(B)	

A: agrégation

D: dispersion

B: blocage sans A ni D.

S: significatif à $P < 0.05$

NS: différence non significative

X: expérience non faite

Le DCI utilisé à 250 microgrammes et à un pH de 6.1 et de 7.2 n'a donné de résultats positifs qu'avec le pH de 6.1 où il a produit une dispersion. Dans tous les cas, l'addition des catécholamines a démontré un blocage complet. Nous n'avons donc obtenu ni agrégation, ni dispersion. Au pH de 7.2, il n'y eut aucune différence entre l'action de l'ADRENALINE et de la NORADRENALINE.

A un pH de 7.2, avec 30 microgrammes d'OXPRENOLOL ainsi qu'après addition des catécholamines, il n'y eut aucun effet puisque les résultats obtenus sont comparables à ceux des témoins. Il faut noter (tableau No. 8) qu'utilisé seul, OXPRENOLOL, est à la limite statistiquement acceptée pour produire une dispersion. 300 microgrammes d'OXPRENOLOL à un pH de 7.2 ont produit une dispersion significative dans un seul cas. L'addition des catécholamines n'a été significative qu'avec l'ADRENALINE où nous avons obtenu une légère dispersion. Considérant les I.M.M. des données brutes, il nous semble qu'encore une fois, les variations entre les écarts de lectures et l'état d'agrégation initial sont responsables de ces résultats. Biologiquement, nous considérons que la NORADRENALINE est plus puissante que l'ADRENALINE sur ce récepteur étant donné l'avance qu'avait une série d'expériences:

Le DCI utilisé à 250 microgrammes et à un pH de 6.1 et de 7.2 n'a donné de résultats positifs qu'avec le pH de 6.1 où il a produit une dispersion. Dans tous les cas, l'addition des catécholamines a produit un blocage complet. Nous n'avons donc obtenu ni agrégation, ni dispersion. Au pH de 7.2, il n'y eut aucune différence entre l'action de l'ADRENALINE et de la NORADRENALINE,

A un pH de 7.2, avec 30 microgrammes d'OXPRENOLOL ainsi qu'après addition des catécholamines, il n'y eut aucun effet puisque les résultats obtenus sont comparables à ceux des témoins. Il faut noter (tableau No.7) qu'utilisé seul, OXPRENOLOL, est à la limite statistiquement acceptée pour produire une dispersion. 300 microgrammes d'OXPRENOLOL à un pH de 7.2 ont produit une dispersion significative dans un seul cas. L'addition des catécholamines n'a été significative qu'avec l'ADRENALINE où nous avons obtenu une légère dispersion. Considérant les I.M.M, des données brutes, il nous semble qu'encore une fois, les variations entre les écarts de lectures et l'état d'agrégation initial sont responsables de ces résultats. Biologiquement, nous considérons que la NORADRENALINE est plus puissante que l'ADRENALINE sur ce récepteur étant donné l'avance qu'avait une série d'expériences:

- 1) \bar{d}_1 : -2.90 : \bar{d}_2 : -6.15 (A)
- 2) \bar{d}_1 : - 8.05: \bar{d}_2 : -15.1 (NA)

Le PRINODOLOL 200 microgrammes au pH 3.5, a été sans effet utilisé seul puisque comparable aux témoins mais l'addition des catécholamines n'a produit ni agrégation, ni dispersion prouvant ainsi le blocage complet des récepteurs par le PRINODOLOL.

TABLEAU No.10: ANALYSE DE VARIANCE DES
TEMOINS

somme des carrés	d.l.	moyenne des carrés
totaux: 4193.60	159	
après traitement: 338.50	7	48.36
résiduel: 3855.10	152	25.36

"F" : 1.91

TABLEAU No.11: ANALYSE DE VARIANCE DES
BLOQUEURS DE TYPE α

somme des carrés	d.l.	moyenne des carrés
totaux: 17,971.89	319	
après traitements: 11,313.19	15	754.21
résiduel: 6658.7	304	21.90

"F" : 34.43

TABLEAU No.12: ANALYSE DE VARIANCE DES
BLOQUEURS DE TYPE β

somme des carrés	d.l.	moyenne des carrés
totaux: 15,083.0	239	
après traitements: 9382.44	11	852.95
résiduel: 5699.85	228	25.00

"F" : 34.12

TABLEAU No.13: ANALYSE DE VARIANCE TOTALE
(témoins, α, β)

somme des carrés	d.l.	moyenne des carrés
totaux: 49,162.83	719	
traitements: 32,949.20	35	941.40
résiduel: 16,213.65	684	23.70

erreur type: 1.54

TABLEAU No.14: ANALYSE DE VARIANCE
COMPARATIVE DES TEMOINS

somme des carrés	d.l.	moyenne des carrés
des traitements: 338.5	7	
entre les catécholamines 15.625	1	15.625
entre les pH : 149.85	3	49.95
entre les pH et les catécholamines: 173.025	3	57.625
résiduel: 3855.1	152	25.362
totaux: 4193.6	159	

3.5 ETUDE DES RESULTATS DES BLOQUEURS DE TYPE α ET
 β SUIVI DE NORADRENALINE

L'addition de la DIBENAMINE a été sans effet significatif (voir tableau No.15) mais peut être considéré comme étant à la limite de la dispersion. L'OX-PRENOLOL n'a pas modifié les lectures de l'I.M.M. sur le Fundulus hétéroclitus mais l'addition de NORADRENALINE a été sans effet i.e. sans dispersion ni aggrégation.

TABLEAU No.15: EFFETS DES BLOQUEURS DE
TYPE α ET β SUR LA REPOSE
AUX CATECHOLAMINES DES
EAILLES DU FUNDULUS HETE-
ROCLITUS IN VITRO (INTER-
PRETATION STATISTIQUE)

Variation de l'I.M.M. après addition de	Interprétation statistique
DIBENAMINE 200 * à pH 7.2 : +3.50	N.S.
Après addition de 1'OXPRENOLOL 200 * à pH 7.2 : +0.45	S (B)
Après addition de NORADRENALINE: -0.70	S (B)

* : microgramme

N.S.: (non significatif) $P < 0.05$

S : significatif

B : Bloquage (sans A ni D)
etc.

4.0 RESULTATS DE L'ETUDE "IN VIVO"

Nous n'avons pas pu établir de statistiques pour cette série d'expériences, à cause d'un problème fondamental dans la méthode; l'index manquait d'étendue et le nombre de poissons était trop petit. Les trois tableaux représentent la moyenne des lectures pour chaque série de poissons à la phase mentionnée.

4.1 ANALYSE DES RESULTATS DES TEMOINS

Le tableau No.17 nous a démontré que le fait de placer le poisson en milieu noir ou en milieu blanc en premier, n'influçait pas sa réaction aux catécholamines. De plus, l'ADRENALINE et la NORADRENALINE ont produit les mêmes effets (tableau No.16) c'est pourquoi nous avons fait nos expériences, par la suite, avec l'ADRENALINE seulement.

4.2 ANALYSE DES RESULTATS DES BLOQUEURS DE TYPE α

Les tableaux No.17 (a et b) donnent les moyennes des résultats de tous les bloqueurs de type α utilisés. Le tableau (a) représente la série d'expériences commencées en milieu noir et le tableau (b) celles commencées en milieu blanc.

TABLEAU No.16: MOYENNE DES RESULTATS
(SELON L'INDEX D'OSTWALD)
OBTENUS APRES LE TRAITE-
MENT DU FUNDULUS HETERO-
CLITUS IN VIVO , PAR LA
SOLUTION SALINE SUIVIE
D'ADRENALINE OU DE NORA-
DRENALINE (ADAPTATION
INITIALE EN MILIEU NOIR)

	\bar{Y}			\bar{Y}	
Adaptation	Noir	6.50	idem	Noir	6.00
	Blanc	2.50		Blanc	2.50
	Noir	6.75		Noir	6.50
	Blanc	3.00		Blanc	2.50
Injection de la solution saline	Blanc	3.25	idem	Blanc	2.75
	Noir	7.00		Noir	6.50
Injection d'ADRENA- LINE	Noir	5.50	injection de NORADRE- NALINE	Noir	6.25
	Blanc	2.25		Blanc	2.75
	Noir	2.25		Noir	2.75

TABEAU No.17 (a): MOYENNE DES RESULTATS OBTENUS APRES LE
TRAITEMENT DES FUNDULUS HETEROCLITUS
IN VIVO, PAR LES BLOQUEURS ADRENERGIQUES
DE TYPE α_1 . SUIVI D'ADRENALINE (ADAPTATION INI-
TIALE EN MILIEU NOIR)

<u>Adaptation</u>	<u>DIBENAMINE</u>	<u>DIBENAMINE*1</u>	<u>PHENOXYBENZAMINE</u>	<u>EEDQ*2</u>	<u>AZAPETINE</u>	<u>PHENTOLAMINE</u>
Noir	6.75	6.25	6.50	6.33	6.25	6.50
Blanc	2.50	2.50	2.50	2.50	2.75	2.50
Noir	6.75	6.50	6.25	6.50	6.50	6.25
Blanc	2.25	2.50	2.75	2.50	2.75	2.25
<u>Addition</u> <u>du bloqueur</u>						
Blanc	4.25	2.25	2.75	2.50	2.75	2.75
Noir	6.50	4.50	6.00	5.50	6.25	5.75
<u>Addition</u> <u>d'ADRENALINE</u>						
Noir	5.50	4.75	6.50	5.83	3.00	6.50
Blanc	4.75	4.25	2.25	4.50	3.00	3.50
Noir	4.55	4.25	4.00	5.50	3.00	5.50

*1 : le seul à avoir reçu NORADRENALINE

*2 : le seul à avoir été fait avec huit (8) poissons

TABEAU No.17 (b): MOYENNE DES RESULTATS OBTENUS APRES LE TRAITEMENT DES FUNDULUS HETEROCLITUS IN VIVO, PAR LES BLOQUEURS D'ADRENERGIQUES DE TYPE α SUIVI D'ADRENALINE (ADAPTATION INITIALE EN MILIEU BLANC)

<u>Adaptation</u>	<u>Y DIBENAMINE</u>	<u>DIBENAMINE*1</u>	<u>PHENOXYBENZAMINE</u>	<u>EEDQ</u>	<u>AZAPETINE</u>	<u>PHENTOLAMINE</u>
Blanc	2.25	2.75	2.75	2.75	2.25	2.25
Noir	6.25	6.25	6.75	6.50	7.00	6.75
Blanc	2.75	2.50	3.00	2.50	2.75	2.50
Noir	6.00	6.50	6.75	6.50	6.75	6.50
<u>Addition du bloqueur</u>						
Noir	6.75	5.50	6.00	6.25	6.75	6.50
Blanc	4.00	3.50	2.75	3.25	2.75	4.50
<u>Addition d'ADRENALINE</u>						
Blanc	4.00	3.50	3.00	4.75	3.00	3.75
Noir	4.25	4.25	4.25	6.75	3.25	5.00
Blanc	4.25	4.25	4.00	5.74	3.00	3.75

*1 : le seul à avoir reçu la NORADRENALINE

Dans ces deux tableaux, nous pouvons constater que si on les compare aux témoins, nous avons mis en évidence un blocage α et une dispersion caractéristique du lien des catécholamines avec le récepteur de type β . Les bloqueurs qui ont donné les résultats les plus concluants sont dans l'ordre, EEDQ, PHENTOLAMINE et PHENOXYBENZAMINE.

L'expérience faite avec la DIBENAMINE suivie d'ADRENALINE et de NORADRENALINE, a confirmé les résultats obtenus avec les témoins; il n'y a pas de différence entre l'ADRENALINE et la NORADRENALINE.

4.3 ANALYSE DES RESULTATS DES BLOQUEURS DE TYPE β

Ce sont les bloqueurs de type β qui nous ont donné le plus de difficultés. Si on les compare aux témoins, ils sont sans effet. Ceci est compréhensible, comme nous l'avons déjà expliqué, l'index ne présentait pas assez de variations pour mettre en évidence une aggrégation plus prononcée surtout avec cette quantité d'ADRENALINE.

Si on compare globalement les résultats des bloqueurs de type β (Tableau No. 18 a et b) avec ceux de type α (Tableau No. 17 a et b), alors un résultat nous semble évident; il y a eu effet des bloqueurs β . Ceux-

TABLEAU No.18 (a): MOYENNE DES RESULTATS OBTENUS APRES LE
TRAITEMENT DES FUNDULUS HETEROCLITUS
IN VIVO , PAR LES BLOQUEURS ADRENERGI-
QUES DE TYPE β SUIVI D'ADRENALINE (ADAPTATION
INITIALE EN MILIEU NOIR)

	OXPRENOLOL		PROPRANOLOL		PRINODOLOL	
<u>Adaptation</u>						
Noir	6.75		6.25		6.25	
Blanc	2.25		2.50		2.75	
Noir	6.50		7.00		6.50	
Blanc	2.50		2.25		2.25	
<u>Addition du bloqueur</u>						
Blanc	2.00		2.25		2.25	
Noir	4.25		6.25		6.25	
<u>Addition d'ADRENALINE</u>						
Noir	4.25		2.50		2.25	
Blanc	2.25		2.00		2.25	
Noir	4.25		2.00		2.25	

TABEAU No.18 (b): MOYENNE DES RESULTATS OBTENUS APRES
LE TRAITEMENT DES FUNFULUS HETEROCLITUS
IN VIVO , PAR LES BLOQUEURS ADRENERGI-
QUES DE TYPE β SUIVI D'ADRENALINE (ADAPTATION
INITIALE EN MILIEU BLANC)

	Y	PROPRANOLOL	PRINODOLOL
<u>Adaptation</u>			
Blanc		2.75	2.75
Noir		6.50	6.50
Blanc		2.50	2.50
Noir		6.25	6.75
<u>Addition du bloqueur</u>			
Noir		6.25	6.00
Blanc		2.75	2.00
<u>Addition d'ADRENALINE</u>			
Blanc		2.25	3.00
Noir		2.25	2.75
Blanc		2.50	2.75

ci- produisant une agrégation. OXPRENOLOL en particulier démontre une difficulté d'adaptation au noir qui est assez prononcé (\bar{Y} :4.25) après addition d'ADRENALINE. Cette difficulté d'adaptation confirme un blocage β par l'OXPRENOLOL.

5.0 DISCUSSION

5.1 ETUDE "IN VITRO"

5.1.1 ANALYSE DE LA TECHNIQUE

Le prélèvement de l'écaille pouvait s'avérer plus difficile certains jours mais en général, nous étions suffisamment habitués pour le faire sans que l'animal ne soit trop effrayé ce qui aurait stimulé la sécrétion d'adrénaline et provoqué une agrégation. Comme les facteurs modifiant l'état des mélanophores varient quotidiennement, certains jours les poissons étaient plus foncés ou plus pâles qu'à d'autres moments. Pour diminuer au minimum l'effet de ces variations sur les résultats, nous avons travaillé avec les différences entre les variations obtenues sans tenir compte de l'état initial d'agrégation ou de dispersion des mélanophores de chaque écaille. Mais comme nous l'avons déjà expliqué dans les résultats, ces états initiaux différents peuvent être cruciaux à certains moments dans l'interprétation des résultats.

Comme tout animal, le Fundulus développe très vite un réflexe conditionné. Il fallut donc tenir compte de son traumatisme et lui accorder

un peu plus de repos lorsque la présence du manipulateur déclenchait chez-lui, un état de panique i.e. une fuite à l'arrière des tuyaux d'aération ou une perte de l'appétit. Cette période de repos redonnait confiance au poisson et lui permettait de revenir à un état plus normal.

Notre technique consistait à placer l'écaille fraîchement prélevée dans une lame concave contenant la solution saline et à évaluer son état d'agrégation ou de dispersion selon l'IMM. Cet index a l'avantage d'être extrêmement simple et de laisser très peu de place à la subjectivité des expérimentateurs. Cependant, il a le désavantage d'être trop peu étendu et il est difficile de travailler avec la bonne concentration d'ADRENALINE. En effet, si l'on diminue la quantité d'ADRENALINE, une augmentation de l'agrégation sera visible, si l'on bloque les récepteurs de type β . Mais l'addition d'ADRENALINE après l'utilisation d'un bloqueur de type α efficace produira une dispersion presque invisible. A moins donc d'élargir l'index, il est difficile de travailler avec des variations possibles de un à cinq (selon l'état d'agrégation ou de dispersion).

Si on laisse l'index tel qu'il est, il est impossible de vérifier l'agrégation et la dispersion en utilisant la même quantité d'ADRENALINE dans les deux cas. Or, varier la quantité d'ADRENALINE dans deux expériences à comparer, ne nous permettait pas d'arriver à une conclusion valable. Avec cette quantité constante d'ADRENALINE et l'étroitesse de l'I.M.M., il nous a été difficile, comme nous le verrons plus tard, de démontrer la présence de récepteurs de type α . Cette difficulté est

minimisée par le fait que la présence de ces récepteurs a déjà été abondamment prouvée par d'autres chercheurs. Malgré ce désavantage, cette méthode reste très utile. La preuve en est que les variations de l'I.M.M. après stabilisation se sont maintenues entre 2.5 et 3.0. De plus, de nombreux expérimentateurs parviennent aux mêmes résultats confirmant ainsi la précision de cette technique. L.I.M.M. est une méthode simple à exécuter et il ne sera pas facile de la remplacer.

5.12 BLOQUEURS DE TYPE α

En comparant les résultats obtenus lors de l'addition *in vitro* de bloqueurs adrénérgiques du type α , nous constatons la présence de deux types de bloqueurs, les réversibles et les irréversibles. Leurs résultats sont consignés dans les tableaux No. 6 et No. 13. Ces résultats confirment la pharmacologie décrite dans Goodman et Guilman (1970), Grollman et Grollman (1971).

Dans ces expériences, nous avons trouvé que l'injection du bloqueur produisait très souvent une dispersion significative qui méritait notre attention. Celle-ci a été attribuée à l'action des catécholamines résiduels ou ajoutés au milieu, qui se sont combinés avec le récepteur β , le récepteur α étant bloqué. La vérification de cette dispersion sera extrêmement importante parce qu'elle permettra de constater que le mélanophore du poisson disperse sous l'influence de récepteurs de type β , son agrégation par les récepteurs de type α n'étant pas mise en doute.

5.121 LES BLOQUEURS REVERSIBLES

L'addition de PHENTOLAMINE au milieu entourant l'écaille donne une

dispersion significative (voir tableaux No. 6 et No. 13). Healey et Ross (1966) ainsi qu'Iwata et al. (1959 a et b) ont eux aussi observé chez le Phoxinus, une dispersion après addition de PHENTOLAMINE. L'action du bloqueur serait donc due à sa structure. Cette structure pourrait être comparable à celle de PHENOXYBENZAMINE (Chang, 1968), et d'autres bloqueurs (Kirshner et al. 1971), qui vident les boutons terminaux du système nerveux adrénergique libérant ainsi la NORADRENALINE qui se combine avec le récepteur β non bloqué alors que le récepteur α était bloqué par la PHENTOLAMINE.

Nous remarquons cependant que l'addition des catécholamines produit une agrégation comparable à celle des témoins. Cette réponse contradictoire est probablement due au fait que, lors de l'addition du bloqueur, les catécholamines résiduels aient été en dose physiologique i.e. plus faible mais permettant la dispersion. La dose de NORADRENALINE et d'ADRENALINE ajoutée étant trop forte en soi et par rapport à la dose du bloqueur, il s'est produit un déplacement du bloqueur du récepteur α par l'addition d'une dose compétitive de catécholamines. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, la PHENTOLAMINE est un bloqueur réversible dont l'action sur le récepteur est compétitive avec celle des catécholamines.

AZAPETINE administré seul, ne produit pas de dispersion significative. Nous ignorons si cette réaction est due à sa structure chimique incapable de vider les boutons terminaux ou à d'autres variables.

Peut-être, d'autres mécanismes ont-ils interféré pour empêcher cette libération. Jack et al. (1970) ont émis l'hypothèse que la transformation en azote quaternaire est faite au pH physiologique. La drogue étant insoluble à ce pH, il a été impossible de contrôler le bien fondé de cette hypothèse. L'addition de catécholamines n'a été significative qu'avec la NORADRENALINE. L'ADRENALINE a donné une agrégation semblable à celle des témoins. La différence entre les catécholamines étant significative, nous pensons que l'ADRENALINE est plus active que la NORADRENALINE sur ce type de récepteur. Ces résultats nous semblent très intéressants; ils nous démontrent que nous étions peut-être au seuil de la zone active de la drogue à cette dose et pour cette quantité de catécholamines.

CHLORPROTHIXENE n'étant pas uniquement un bloqueur de type α mais surtout "un tranquillisant" (analogue à la PHENOTHIAZINE), il est compréhensible que son action ne se soit pas exercée sur les boutons terminaux. Nos résultats sont surprenants si l'on considère qu'Abbott (1968) utilisant un dérivé de la PHENOTHIAZINE, la CHLORPROMAZINE, a obtenu une dispersion, mais la dose du bloqueur était de 1mg. Toutefois, Puig et Kirpekah (1971) avaient remarqué qu'un pH acide inhibait la libération de NORADRENALINE soit en interférant dans un processus enzymatique intermédiaire, soit en réduisant la quantité de calcium disponible. L'addition des catécholamines a produit un blocage complet peut-être à cause de la forte dose et/ou du pH utilisé ce qui peut avoir tout simplement perturbé la membrane au lieu d'avoir bloqué les récepteurs de type α ou β . Des expériences à doses plus faibles permettraient

de vérifier cette hypothèse.

5.122 LES BLOQUEURS IRREVERSIBLES

Avec 200 microgrammes de DIBENAMINE, la drogue seule nous a donné une dispersion significative au pH 7.2 et 5.0 ainsi qu'avec 100 microgrammes au pH 7.2. Aucune différence n'est apparue au pH 6.1 avec 200 microgrammes et il est difficile d'expliquer ce résultat sauf si l'on considère les variations individuelles possibles chez un animal. Cette dispersion a été observée chez l'Oryzias par Watanabe et al (1962), par Abbott (1968) chez le Fundulus, par Healey et Ross (1966) chez le Phoxinus et par Scott (1965) chez le Scophthalmus. Goldman et Hadley (1969, 1970), ont obtenu les mêmes effets dispersant de la DIBENAMINE sur les mélanophores du lézard Anolis carolinensis. L'effet dispersant du bloqueur n'est donc pas fonction de pH. Nous avons obtenu cette dispersion à différents pH avec la DIBENAMINE et de plus, aucun auteur n'a fait mention du pH utilisé.

Les résultats de l'addition des catécholamines présentent un grand intérêt. Avec 200 microgrammes et au pH de 7.2, la dispersion obtenue est des plus marquée et la même dose aux pH acides produit un blocage complet dont l'intensité varie avec le pH (voir graphique No. 1).

L'écaille du poisson possède une barrière de lipides que l'on a longtemps crue partie du récepteur. Aux pH acides, cette barrière pourrait être moins efficace et ainsi favoriser une pénétration plus grande du bloqueur vers le récepteur. A ces pH, la quantité de bloqueur parvenant aux récepteurs de type α et β , deviendrait tellement plus importante que les

récepteurs en seraient saturés. Goodman et Guilman (1970) ont noté que la DIBENAMINE à forte dose, peut se combiner aux récepteurs du type α , du type β , à ceux de la sérotonine et de l'acétylcholine. Cette saturation des récepteurs expliquerait l'absence de réaction de la part du mélanophore dans un sens ou dans l'autre après l'addition des catécholamines.

Young et Marks (1969) avec des isotopes radioactifs établirent que la dibenzylaminoéthanol ne produit pas de lien alkylant i.e. irréversible avec le récepteur. La preuve établie à partir de l'utilisation de DIBENAMINE C_{14} , exclut l'hypothèse d'un site actif situé dans la fraction lipidique.

La solubilité de DIBENAMINE varie beaucoup avec le pH du solvant. Ceci nous permet de croire qu'aux pH acides, la quantité de bloqueurs arrivant aux récepteurs s'en trouve augmentée. Ceci amène un surdosage de la DIBENAMINE sous forme de dibenzylaminoéthanol qui traverse plus facilement la fraction lipidique à ces pH acides.

Par contre, si la faible solubilité du bloqueur au pH 7.2 en diminue la quantité qui traverse la fraction lipidique, alors une dose normale atteint le récepteur α et donne le résultat attendu: ce résultat étant une dispersion caractéristique du blocage du récepteur α et de la réaction avec le récepteur β des catécholamines ajoutés.

En observant ces résultats, il nous faut considérer d'autres hypothèses permettant d'éclairer cette notion de récepteur.

En effet, les propriétés alkylantes de DIBENAMINE se manifestent habituellement à pH 7.0 et au-dessus (Wickerson 1949). Aux pH acides, il faudrait attendre un temps extrêmement long pour que la cyclisation de l'azote se produise. On peut se demander si le milieu intérieur de l'é-caille peut rétablir le pH physiologique ou si l'on doit uniquement considérer le pH extérieur. Ce problème n'étant pas résolu, il reste donc la possibilité de croire que le lien avec le récepteur se soit produit par simple attraction électrostatique et non par alkylation à ces pH.

Peut-être aussi, ces pH acides et cette forte molarité ont-ils perturbé les membranes modifiant ainsi le transport actif. La membrane contient une forte proportion de groupements carboxyles avec lesquels, le bloqueur peut réagir empêchant ainsi toute forme de transport actif à travers la membrane et produisant une réponse qui ressemble à un blocage des deux récepteurs α et β .

La voie est ainsi ouverte à d'autres expériences qui seraient nécessaires pour bien établir si les récepteurs eux-mêmes ont été bloqués ou si une étape de ce mécanisme si complexe n'a pas été arrêtée empêchant ainsi la manifestation de cette réponse aux catécholamines lors des expériences aux pH 5.0 et 6.1.

La mise en évidence de la très forte influence du pH pour l'absorption de la DIBENAMINE au niveau des récepteurs est un élément important que nous soulignons au cours de cette recherche.

Arbab et Turner (1971) ont plus récemment, émis l'hypothèse de cette influence pour la thymoxamine dans la muqueuse buccale de l'homme. La pénétration diminuant de façon substantielle avec la diminution du pH. Ceci confirme notre hypothèse mais dans un système aussi différent qu'une écaille de poisson et avec une drogue différente.

Nickerson (1967) parlant des récepteurs en général, avait bien cerné la difficulté de mesurer la dose administrée étant donné que l'on ne connaît ni le nombre de récepteurs nécessaires pour donner une réponse, ni la concentration de la drogue dans l'entourage immédiat du récepteur. Une barrière de diffusion fut mise en évidence par Kalsner, tel que décrit par Nickerson (1967) et il semble que la diffusion et par conséquent l'équilibration soit un facteur à considérer dans l'étude des interractions drogue-récepteur. Nous avons donc présumé que cette concentration est celle du liquide entourant le tissu, ou l'écaille dans ce cas précis.

De plus, les expériences faites avec les écailles comme témoins sans bloqueur et à différents pH, parfois additionnés d'alcool (agent de solubilisation nécessaire dans certains cas) n'ont pas donné de différences significatives. En aucun cas, les données pharmacologiques de l'action de ces bloqueurs sur les muscles lisses des mammifères n'ont été contredites. Spaeth (1916) avait tenté d'établir cette relation mais sans trop de succès.

La dispersion plus prononcée obtenue avec la DIBENAMINE et la PHENOXYBENZAMINE a été étudiée par plusieurs auteurs et Chang (1968) a mis en évidence, avec la PHENOXYBENZAMINE, une action au niveau des boutons termi-

naux pour vider les réserves d'adrénaline. Cette action a été démontrée par l'addition, au milieu, de Réserpine (substance qui épuise les réserves d'adrénaline) avant l'addition de PHENOXYBENZAMINE et l'effet dispersant de la drogue seule a été éliminé.

Comme la DIBENAMINE et la PHENOXYBENZAMINE ont des structures similaires, on peut supposer que leur mode d'action au niveau des boutons terminaux est le même. Il est important de ne pas perdre de vue que la DIBENAMINE et la PHENOXYBENZAMINE ont pu, à forte dose ou à pH acide, perturber les propriétés physico-chimiques de la membrane.

En effet, la PHENOXYBENZAMINE a elle aussi produit une dispersion significative lors de son addition au milieu entourant l'écaïlle. Cette dispersion avait été observée chez le Phoxinus par Healey et Ross (1966) et chez le Scophthalmus par Scott (1965).

EEDQ fait partie des bloqueurs de type α irréversible mais d'un groupe chimique tout à fait différent de celui de la DIBENAMINE et de la PHENOXYBENZAMINE. A une dose de 100 microgrammes il n'a pas produit la dispersion de la majorité de bloqueurs, il n'a pas donné de différence significative avec les témoins peut-être à cause du mode d'action à cette dose. Si on le compare aux expériences faites avec 25 microgrammes, alors il a produit une agrégation statistiquement significative. En effet, avec 25 microgrammes, la dispersion est significative. Si aux 100 microgrammes de EEDQ on ajoute les catécholamines, on obtient alors un blocage des deux types de récepteurs et peut-être aussi un effet sur la membrane qui empêche

tout transport actif comme déjà mentionné. Nous émettons cette hypothèse à cause de la différence entre l'addition des bloqueurs et des doses différentes.

Pour ce qui est de l'action des catécholamines après le blocage avec 25 microgrammes de EEDQ, la dispersion obtenue est significative, mettant en évidence le blocage de récepteurs de type α et le lien des catécholamines avec les récepteurs de type β produisant ainsi la dispersion de la mélanine. Ceci met en évidence la présence de récepteurs de type β dans les écailles du Fundulus heteroclitus. La dispersion produite par l'addition des catécholamines est la même (4.85 et 4.80), malgré l'état beaucoup plus dispersé (14) des mélanophores avant l'addition de l'ADRENALINE par rapport à ceux précédant l'addition de la NORADRENALINE (5.85). Le résultat final étant le même, nous pouvons conclure qu'ici l'ADRENALINE est plus active que la NORADRENALINE. EEDQ étant une drogue de découverte relativement récente, elle n'a pas encore été utilisée au cours d'expériences sur le changement de couleur du poisson.

Il se peut aussi, qu'avec 100 microgrammes, après l'addition des catécholamines, un blocage total se montre par perte de la spécificité au récepteur α . Comme les autres bloqueurs, il subit l'action de masse. A 25 microgrammes, l'ADRENALINE et la NORADRENALINE produisent une dispersion caractéristique du lien des catécholamines avec le récepteur β . Malgré sa structure différente des autres bloqueurs du type α , EEDQ s'est comporté comme la DIBENAMINE utilisée à forte dose et à faible dose.

Belleau (1972, communication personnelle) a remarqué que le EEDQ, comme beaucoup d'autres bloqueurs, est sélectif aux récepteurs de type α mais que sa spécificité est très relative. N'importe quel groupement carboxyle réagit avec le EEDQ et sa sélectivité est très fortement influencée par sa concentration. Néanmoins, il lui fut impossible de dissocier le blocage des récepteurs de type α de ceux de l'hydroxytryptamine ce qui confirme la difficulté de sa spécificité. Le mécanisme proposé ne permet pas de savoir avec quel agent réagit le EEDQ. En effet, l'addition de nucléotides est restée sans effet et des études sur l'adényl cyclase ont démontré que l'enzyme n'est pas impliqué quelque en soit la dose.

5.13 BLOQUEURS DE TYPE β

Utilisé seul à une dose de 200 microgrammes et au pH de 7.2, le PROPRANOLOL, substance étalon des bloqueurs adrénérgiques de type β (Dollerey et al. 1969), produit sur l'échelle un résultat qui ne diffère pas de celui des témoins. L'addition de NORADRENALINE ne donne ni agrégation, ni dispersion. Ariens et Simoris ont démontré qu'à dose massive, un bloqueur adrénérgique de type β peut se combiner avec le récepteur α . Il s'agit dans ce cas, d'un mode d'action similaire à celui de la DIBENAMINE. Patil et al. (1968) ont étudié leur action sur les récepteurs de type α et ils en sont venus à la conclusion que tous les bloqueurs de type β peuvent bloquer les récepteurs de type α . Ceci ne semble pas tenir à leur propriété de bloqueur de type β puisque les isomères optiques sont aussi efficaces sur le récepteur α alors que seul la forme L est active sur le récepteur de type β . Pour obtenir un tel blocage, Patil et al. ont trouvé qu'il fallait des doses beaucoup plus fortes que pour bloquer le récepteur β seul. Les résultats de notre étude démontrent qu'avec l'échelle la dose nécessaire pour obtenir un tel blocage est beaucoup moins forte.

Avec 10 microgrammes, le PROPRANOLOL produit une agrégation dans un cas seulement. Ceci nous semble une indication que, dans ce cas, le récepteur β a été bloqué. Nous sommes certainement très proche du seuil d'activité de la drogue. L'addition de catécholamines n'a été significative que dans le cas de l'ADRENALINE. Malheureusement, nous ne pouvons pas conclure de façon certaine ici puisque l'état d'agrégation initial des mélanophores était statistiquement différent. Comme nous l'avons déjà mentionné, ces différences peuvent favoriser ou défavoriser certaines expériences. De plus, vue la forte dose de catécholamines utilisées et puisque les bloqueurs de type β sont tous compétitifs, le PROPRANOLOL a peut être été renversé.

OXPRENOLOL 30 microgrammes à pH 7.2, a été comparable aux témoins dans les expériences où il a été utilisé seul ou après addition de catécholamines. A cette dose, il n'a donc pas bloqué le récepteur de type β .

Avec 300 microgrammes, l'addition de la drogue n'a produit de résultats significatifs que dans le cas d'une des deux expériences et ce résultat est une dispersion que nous ne pouvons expliquer. La différence entre les deux phases traitées par le bloqueur est statistiquement différente. L'addition d'adrénaline a fait varier les lectures ($\bar{d}_1 + 2.90$) à ($\bar{d}_2 - 6.15$) ce qui est un résultat

significatif. Lorsqu'on ajoute la NORADRENALINE celles-ci passent de $\bar{d}^1 + 8.05$ à $\bar{d}^2 - 15.10$ ce qui rend le résultat non significatif mais que nous interprétons comme étant dû au fait que la NORADRENALINE est ici plus active que l'ADRENALINE.

Le PRINODOLOL, une substance 4 à 7 fois plus active que le PROPRANOLOL (Moore et O'Donnell 1970, Grudicelli et al. 1969) n'a donné aucune différence avec les témoins lorsqu'utilisé seul. L'addition des catécholamines a été significative; dans les deux cas, elle a produit un blocage complet obéissant ainsi à la loi d'action de masse qui veut qu'à fort dosage, il n'y ait plus de spécificité (Mazurkiewicz-Kuilecki 1970).

Le DCI, 250 microgrammes à un pH de 6.1, a produit une agrégation significative. Scott (1965) avait obtenu une dispersion au lieu d'une agrégation, cette différence peut être due à la très forte activité intrinsèque sympathomimétique déjà expliquée. Nos résultats sont cependant similaires à ceux de Goldman et Hadley (1969 et 1970) sur la peau du lézard Anolis carolinensis.

La même dose de DCI, à un pH de 7.2 n'a pas donné de différence significative. A ces deux pH, l'addition des catécholamines a démontré un blocage complet. Nous

ignorons s'il s'agit d'un effet de membrane ou d'un blocage des deux types de récepteurs empêchant la dispersion ou l'agrégation de la mélanine.

5.14 GENERALITES SUR L'ETUDE "IN VITRO"

D'une façon générale, nos travaux sur les récepteurs de type α du Fundulus ont permis grâce aux bloqueurs de ce type de mettre en évidence la dispersion que donne les récepteurs de type β lorsqu'ils se combinent avec les catécholamines endogènes ou exogènes. Certains bloqueurs de type β ont donné, lorsqu'utilisé seul, une agrégation caractéristique du lien des catécholamines résiduels avec les récepteurs de type α . Mais la dose de NORADRENALINE et D'ADRENALINE était beaucoup trop forte pour des bloqueurs réversibles et compétitifs comme le sont les bloqueurs de type β . Ceci a donné des résultats parfois moins concluants. L'index n'étant pas assez étendu, nous ne pouvions utiliser une dose plus faible qui aurait rendu les résultats imperceptibles.

Notre recherche aurait été grandement facilitée si des bloqueurs parfaitement spécifiques existaient. Ceci nous aurait permis de conclure si le système adrénérgique est le seul ou non à intervenir dans le changement de couleur du poisson que nous avons étudié. Les résultats obtenus sur l'écaille nous persuadent qu'il joue un rôle primordial dans le mécanisme de changement de couleur rapide.

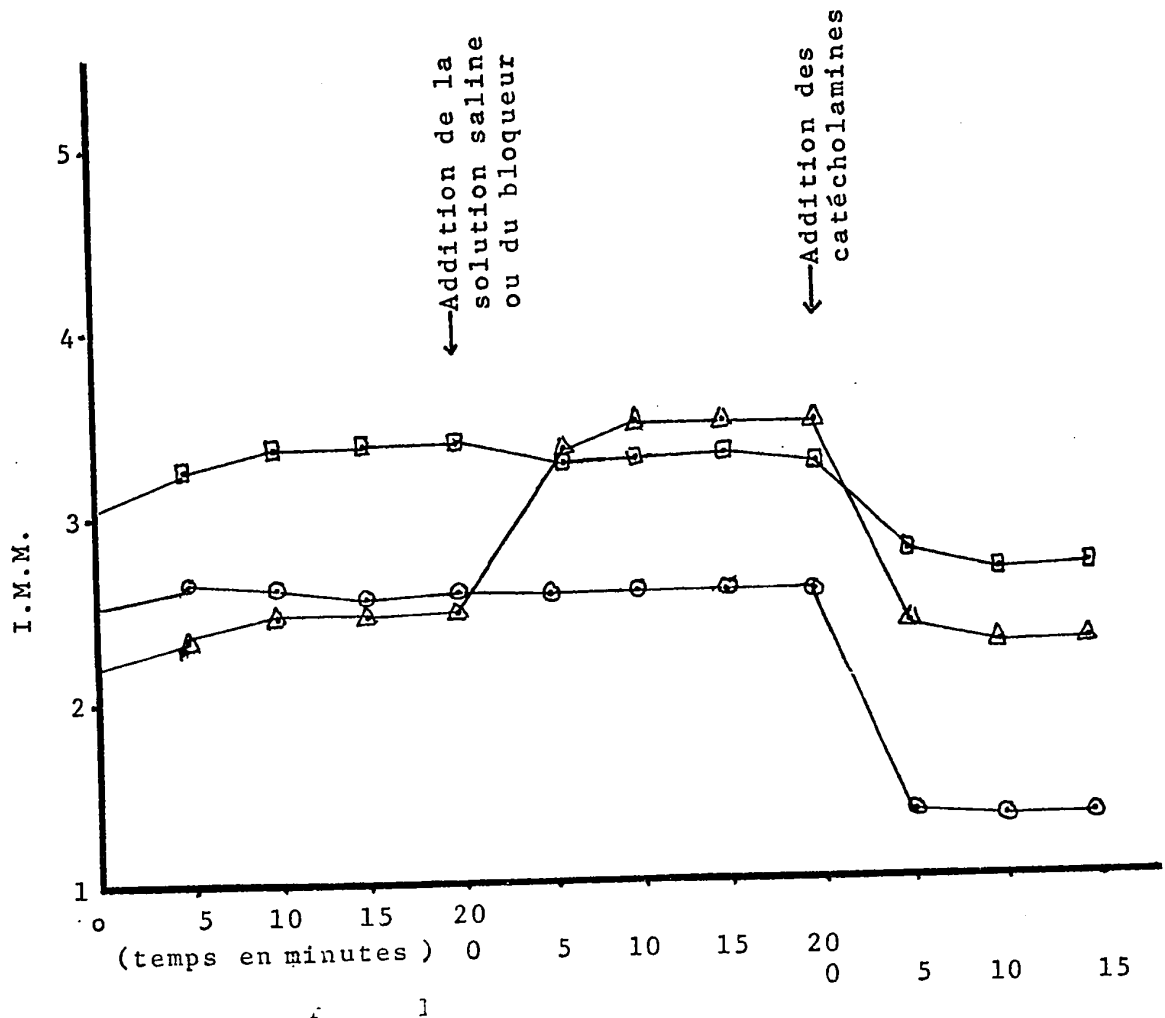
La technique in vitro est une des meilleures à date pour l'étude des récepteurs adrénérgiques. Il nous semble que l'utilisation des écailles du Fundulus hétéroclitus pourrait être plus répandue pour l'étude des récepteurs adrénérgiques, en raison de la simplicité de l'organisation qu'elle demande et de la précision des résultats qu'elle donne. Ceci nous a d'ailleurs été confirmé par les études statistiques.

Les variations de l'I.M.M. sont presque toujours, pour la période de stabilisation, entre 2.5 et 3.0 ce qui constitue une variation très raisonnable.

Si l'on considère les différentes phases de l'expérience, nous pouvons voir dans le graphique No.2, qu'elles ont été suffisamment longues pour permettre d'attribuer les résultats aux drogues utilisées et non aux variations naturelles qui auraient pu s'établir. Nous remarquons qu'à chaque fois qu'une drogue est ajoutée, nous avons déjà atteint un plateau.

GRAPHIQUE No.2

COURBE REPRESENTANT LA REACTION DES
MELANOPHORES DU FUNDULUS HETEROCLITUS
PENDANT LES ETAPES DE STABILISATION,
D'ADDITION DU BLOQUEUR OU DE LA
SOLUTION PHYSIOLOGIQUE ET DE L'ACTION
SUBSEQUENTE DES CATECHOLAMINES.



○ : Solution saline (pH 7.2) suivie de NORADRENALINE

Δ : PHENTOLAMINE 1 μ gm (pH 5) suivie de NORADRENALINE

◻ : PROPANOLOL 10 μ gm (pH 7.2) suivie d'ADRENALINE

5.15 BLOQUEURS DE TYPE α ET DE TYPE β

Quant à nos expériences sur les interréactions possibles entre les bloqueurs de type α et de type β , il nous a été impossible, comme ce fut le cas pour Yamamura et Akira (1968) et Chang et Wuan (1971), de reproduire les résultats de Hull et al (1960), Gulati et al. (1965) et Olivares et al. (1967). Ceux-ci avaient émis l'hypothèse d'une interréaction entre le bloqueur α et le bloqueur β .

Nous avons administré la DIBENAMINE et l'OXPRENOLOL à des doses qui, utilisées chacune seule, bloqueraient respectivement le récepteur α et le récepteur β . Les résultats observés confirment la dispersion obtenue par la DIBENAMINE dans les autres expériences "in vitro". Cependant, cette dispersion se situe à la limite statistiquement significative ($+3.50$), elle est donc beaucoup plus faible que celle de nos autres expériences ($\bar{d}^1 +5.90 +8.80$). Ceci peut s'expliquer par l'état initial de l'IMM relativement élevé que nous avons. En effet, nos variations de lectures sur l'IMM se situent entre 2 et 4 après la stabilisation, la majorité se situant entre 3 et 4. Cette situation diffère de l'état habituel où la variation de nos lectures à la fin de la période de la stabilisation se situait entre 2.5 et 3 ou 3.5 au maximum. Il était donc presque impossible à la DIBENAMINE d'intensifier la dispersion.

L'addition d'OXPRENOLOL ne semble pas modifier le milieu et la dispersion reste comparable à celle des témoins. Biologiquement ce phénomène s'explique par le fait qu'OXPRENOLOL ne pouvait produire le même résultat que s'il avait été utilisé seul à cause de la dispersion déjà élevée obtenue après l'action de la DIBENAMINE.

Les catécholamines ont produit une différence statistiquement significative. S'il y avait eu interréaction, nous aurions constaté une agrégation due au renversement de la DIBENAMINE par l'OXPRENOLOL tel que déjà postulé; au contraire, nous avons eu un blocage complet.

Le renversement du bloqueur de type α par le bloqueur de type β ne s'est donc pas produit sur l'échelle du Fundulus hétéroclitus. Nous pouvons donc éliminer cette hypothèse. Nos résultats s'accordent donc avec ceux de Yamamura et Akira (1968) et Chang (1971) pour qui l'agrégation observée chez les autres auteurs serait due à l'effet résiduel des récepteurs de type α qui n'auraient pas été bloqués au départ.

Supposons un nombre hypothétique et total de 100 récepteurs de type α et de 40 récepteurs de type β . Si la dose de DIBENAMINE n'a pu bloquer que 80 des récepteurs de type α , ceci est suffisant pour qu'apparaisse l'effet des

récepteurs de type β . Si l'on bloque ensuite la totalité des récepteurs de type β par l'OXPRENOLOL, alors l'effet résiduel des 20 récepteurs de type α réapparaît.

Le bloqueur β , OXPRENOLOL, utilisé au cours de ces expériences est un des plus puissants que l'on connaisse à date. Nous n'avons aucun indice permettant de croire qu'il aurait une affinité pour le récepteur α . On peut donc supposer qu'il ne déplace pas la DIBENAMINE, ou que s'il l'a déplacée, il occupe son site d'action sur le récepteur α sans être lui-même déplacé par les catécholamines comme l'a été le PRONETHALOL utilisé par Gulati et al. (1965). Les résultats obtenus par Gulati et al. (1965) sont peut être dûs à l'utilisation d'un bloqueur du type β ayant une trop faible activité pour le récepteur α si on le compare au bloqueur α utilisé au cours de l'expérience. En effet, l'affinité du PRONETHALOL pour le récepteur α est faible ($pA_2:5.3$) celle de la PHENTHOLAMINE est forte ($pA_2:8.3$). Ceci expliquerait pourquoi le PRONETHALOL n'a pu bloquer le récepteur α et que l'addition des catécholamines a donné une agrégation.

Dans notre cas, à un pH de 7.2, la DIBENAMINE semble irréversiblement liée au récepteur α . Il est donc à noter qu'aucune expérience in vitro ne donne le pH des solu-

tions de bloqueurs utilisés. Peut être les solutions d'Olivares et al. (1967) étaient elles à un pH. où le lien de la PHENOXYBENZAMINE se produit par simple attraction électrostatique d'où l'action possible des catécholamines sur les récepteurs α si on les utilise à doses compétitives. Nous ignorons ce qui s'est produit au cours de cette expérience et nous ne pouvons que constater les différences entre les résultats obtenus par notre expérience et ceux obtenus par les autres auteurs. Statistiquement, OXPRENOLOL et la NORADRENALINE ont été sans effet mais biologiquement nous pouvons penser que peut être nous avons bloqué les deux types de récepteurs. Peut être aussi, avons-nous tout simplement perturbé la membrane, modifiant ainsi ses mécanismes de transport. Il est dans nos intentions de reprendre cette expérience plus tard de façon à chercher la solution du problème des interréactions soulevé dès 1960 par Hull et al. Notre technique serait alors très différente, l'addition de DIBENAMINE serait suivi de NORADRENALINE puis un lavage complet serait effectué, ensuite seulement nous ajouterions OXPRENOLOL et par la suite NORADRENALINE. Ce système de lavage continu demande un équipement que nous n'avions pas pour permettre à l'écaille de rester vivante et de renouveler ses ions dans le milieu au lieu de s'épuiser. La technique que nos moyens matériels nous ont obligés d'utiliser aurait produit la déshydratation du milieu et augmenté ainsi la concentration ionique du liquide entourant l'écaille.

Ces expériences nous obligent à considérer le fait que nos résultats sont presque identiques à ceux obtenus chez les mammifères si l'on tient compte de la différence de sensibilité de l'écaille aux différents bloqueurs. Certains bloqueurs auraient pu être sans activité sur les récepteurs des mélanophores du Fundulus mais cela n'a pas été le cas. Comme très peu d'études sur les récepteurs adrénérgiques ont été faites sur d'autres groupes d'animaux que les mammifères, ces résultats que nous avons observés présentent un intérêt considérable quant à l'évolution des récepteurs. Nous sommes en effet forcés d'admettre que le système est resté sensiblement le même chez les différents organismes.

Les sites actifs qui réagissent avec les bloqueurs n'ont donc démontré aucun changement pendant l'évolution. Ce serait plutôt la réponse physiologique de l'animal qui aurait changé au cours de l'évolution soit par la modification d'unités secondaires de l'enzyme du récepteur, soit par celle d'un des intermédiaires entre le récepteur et la réponse de l'animal. Là encore, ces résultats que nous avons obtenus incitent à une étude plus approfondie permettant d'élucider ce problème.

5.2 ETUDE IN VIVO

5.21 ANALYSE DE LA TECHNIQUE

Nous avons constaté que l'Index d'Ostwald modifié, bien qu'il donne des résultats valables et possibles à contrôler sur le plan biologique, n'est pas assez étendu. Cette lacune en rend l'application statistique impossible à faire. Il s'agit, dans les circonstances, d'un problème fondamental. En effet, si on compare l'Index d'Ostwald modifié, à celui de mélanophores moyens (I.M.M.) de l'étude in vitro, il semble plus étendu parce qu'il varie théoriquement de 0 à 8. Il est facile de voir que le 0 et le 1 étant de couleur très blanche et le 8 d'un noir très intense, aucun poisson ne peut pratiquement atteindre ces couleurs. Il nous reste donc un index variant de 2 à 7, où il est presque impossible de trouver des décimales comme dans l'I.M.M. Lorsque la variation est si minime, il faut procéder à l'expérimentation sur un nombre plus grand de poissons, processus que nous ignorions. Nous n'avons donc pas de preuves statistiques pour cette série d'expériences mais nous avons des

preuves biologiques. Nous aurions pu diminuer la quantité d'ADRENALINE administrée mais là aussi les variations de l'Index auraient été trop faibles pour l'analyse statistique.

L'étude des témoins n'a pas montré de différence entre la réaction des poissons soumis à l'action de la NORADRENALINE et de l'ADRENALINE. Pour cette raison, seule l'ADRENALINE a été utilisée dans les expériences qui ont suivi.

Notre technique consistait à injecter le bloqueur sur 4 poissons en milieu noir et sur 4 poissons en milieu blanc. L'adaptation première en milieu noir ou en milieu blanc du Fundulus hétéroclitus n'avait aucune influence sur leur adaptation ultérieure quand la couleur du milieu changeait. Aucune différence ne s'est manifestée dans l'ordre du processus peu importe si l'adaptation première était en milieu blanc ou noir. Cependant, l'état de dispersion ou d'agrégation avant l'addition du bloqueur des catécholamines était très important..

L'étude in vivo a été aussi compliquée par le fait que travaillant avec un animal entier, nous devions respecter le comportement naturel de l'animal dans la mesure du possible, comme dans toute expérience in vivo .

Nous n'étions malheureusement pas équipés adéquatement pour ce genre d'étude et l'animal a dû être traité avec les bloqueurs à la température de la pièce. D'après Doudoroff (1945) ceci n'est pas un inconvénient majeur. Pour tenter de diminuer ce traumatisme, nous avons dû l'adapter graduellement à une température plus chaude pendant deux jours.

L'expérience se faisant dans un bécher de 1000ml, soulevait un problème important. Si l'on considère qu'un poisson noir surpris en milieu blanc ou inversement et confiné dans un volume aussi exigü est automatiquement pris de panique, ceci déclenche une sécrétion très forte d'ADRENALINE endogène. Il est aussi possible que le Fundulus utilise d'autres mécanismes pouvant conduire à un changement de couleur. On sait qu'en biologie, il est rare qu'un mécanisme important pour la survie d'un animal ne soit contrôlé que par un seul processus. Il n'est donc pas surprenant que nous ayons obtenu des variations individuelles en dedans de chaque groupe ainsi que des réactions physiologiques variables d'un animal à l'autre (ex. le vomissement).

L'utilisation de béciers entourés de cartons noir ou blanc permettait de transférer le poisson rapidement, éliminant ainsi le traumatisme de la manipulation.

Pour éviter l'écoulement de liquide à travers la plaie toutes les solutions infectées l'ont été à 0.1 ml.

5.22 ETUDE DES BLOQUEURS DE TYPE α

L'Index étant peu étendu, l'état de dispersion ou d'agrégation initial est très important. Pour cette raison, il nous a été impossible de mettre en évidence le récepteur de type α , d'une façon plus totale que dans l'expérience in vitro. Par contre, le récepteur du type β a été mis en évidence par la très forte dispersion obtenue après l'addition des catécholamines surtout avec EEDQ et dans une moindre mesure avec PHENTOLAMINE. Il faudrait donc exploiter davantage les possibilités de EEDQ comme bloqueur adrénergique de type α .

DIBENAMINE et PHENOXYBENZAMINE donnent des résultats beaucoup moins puissants que EEDQ et PHENTOLAMINE et aussi que ceux qu'ils ont donnés lors de l'étude in vitro. Ceci peut être dû au fait que 30 minutes est un laps de temps insuffisant in vivo pour permettre la réaction avec le récepteur par cyclisation du bloqueur.

Grove (1969 b) avec le Phoxinus phoxinus L aurait pu conclure à l'existence de récepteurs de type α et β parce que l'injection de DIBENAMINE a produit une disper-

sion et l'injection de PRONETHALOL, un bloqueur de type β , une agrégation. Malheureusement, à cause d'une expérience où il a injecté simultanément un bloqueur α et β et où il a obtenu une dispersion, il a conclu à l'inexistence des récepteurs de type β , considérant le renversement de l'action de l'ADRENALINE comme étant dû à d'autres facteurs que la réaction de l'ADRENALINE avec le récepteur β . A notre avis, c'est l'injection simultanée des deux drogues qui a provoqué ce résultat. Il aurait donc favorisé la réaction du bloqueur le plus puissant avec le récepteur d'où blocage α et dispersion caractéristique du lien de l'ADRENALINE avec le récepteur β . Les mêmes conclusions avaient été établies par Pye (1964 a et b) chez le Phoxinus phoxinus. Le problème du Phoxinus est cependant différent de celui du Fundulus. Chez le Phoxinus, le problème du changement de couleur dépend du système nerveux et du système hormonal comme le décrivent Healey et Ross (1966). Chez le Fundulus, il y a une très forte prédominance du système nerveux et si le système hormonal y participe, ce n'est certainement pas pour le changement de couleur rapide que l'on étudie ici mais dans les changements à long terme.

5.23 ETUDE DES BLOQUEURS DE TYPE β

L'analyse des résultats nous permet de conclure que si nous avions pu faire des statistiques, nous aurions trouvé que les bloqueurs de type β sont sans effet.

Biologiquement, nous ne pouvons admettre ce résultat, à cause des déficiences déjà mentionnées dans la technique. De plus, si on compare le EEDQ avec le PROPRANOLOL, on peut voir l'antagonisme exercé par les deux récepteurs de type α et β .

Ce qui nous semble le plus intéressant est le résultat obtenu par OXPRENOLOL, comme nous l'avons déjà mentionné, tous les poissons de ce groupe ont été incapables de s'adapter aussi bien que chez les témoins au milieu noir. Cependant, il y a eu une légère dispersion ($\bar{Y}:4.25$). Ceci nous porte à croire que chez l'animal entier, d'autres mécanismes collaborent à la dispersion.

Plus récemment, Williams et al. (1972) ont mis en évidence avec le rein, une agrégation causée par le récepteur de type α et une dispersion par le récepteur de type β et par celui de l'acétylcholine. Toutefois, les deux mécanismes de dispersion étaient très différents l'un de l'autre. Peut être la même chose s'est-elle produite ici.

Peut être devrions-nous bloquer les deux récepteurs de type α et β , en trouvant leur dose d'activité minimale respective et ensuite travailler avec le récepteur de l'acétylcholine. Une approche plus biochimique aiderait peut être à élucider ce qui in vivo permet au poisson de réagir d'une façon plus nuancée qu'in vitro .

BIBLIOGRAPHIE

1. ABBOTT, F.S. 1968. The effects of certain drugs and biogenic substances on the melanophores of Fundulus heteroclitus. Can. J.Zool. 46: 1149-116.
2. ABBOTT, F.S. 1969. The effects of light and temperature on isolated melanophores in Fundulus heteroclitus. Can. J. Zool. 47: 203-208.
3. ABBOTT, F.S. et SCHWARTZ, F.J. 1968. Observation on air shipments and experimental use of cyprinodont fish Fundulus heteroclitus. Can. J. Zool. 46: 611-613.
4. AGARWAL, S.L. et HARVEY, S.C. 1956. Mechanism of long duration of action of dibenzylamine. J. Pharmacol Exp. Therap. 117: 106.
5. AHLQUIST, R.P. 1948 . A study of adrenotropic receptors. Amer. J. Physiol. 153: 586-600.
6. ARBAB, A.G. et TURNER, P. 1971. Influence of pH on absorption of thymoxamine through buccal mucosa in man. Brit. J. Pharmacol. G.B. 43: 479-480.
7. ARIENS, E.J. et SIMONIS, A.M. 1964. A molecular basis for drug action. J. Pharm. Pharmacol. 16: 137-157.

8. BELLEAU, B. 1967. Stereochemistry of adrenergic receptor: newer concepts on the molecular mechanism of action of catecholamines and antiadrenergic drugs at the receptor level. Annals of the New York Academy of Sciences. New adrenergic blocking drugs: their pharmacological, biochemical and clinical actions, 139, art. 3: 580-605.
9. BELLEAU, B., DITULLIO, V. et GODIN, G. 1969. The mechanism of irreversible adrenergic blockade by N-Carbethoxydihydroquinolines. Model studies with typical serine hydrolase. Biochem. Pharmacol. 18: 1139-1144.
10. BELLEAU, B. et MALEK, G. 1968. A new convenient reagent for peptide syntheses. J. Amer. Chem. Soc. 90: 1651-1652.
11. BOWMAN, R.O. et DAVIDSOHN, I. 1956. Hand-book of biological data (tableau No. 41, page 55). Ed. Spector William S. Saunders WB. Co. Philadelphia 584 pages.
12. CHANG, C.C. et WUAN, H.W. 1971. Antagonism by propranolol of the inhibitory effect of phenoxybenzamine on noradrenaline uptake in vivo. J. Pharm. Pharmacol. G.B. 23: 911-917.
13. CHANG, P. 1968. Sympathomimetic action of phenoxybenzamine on rat heart. Europ. J. of Pharmacol. 4: 240-245.
14. DALE, H.H. 1906. On physiological action of ergot. J. Physiol. (London) 34: 163.
15. DOLLEREY, C.T., PATERSON, J.W. et CONOLLY, M.E. 1969. Clinical pharmacology of betâ-receptor-blocking drugs. Clin. Pharmacol. Ther. 10: 765-789.
16. DOUDOROFF, P. 1945. The resistance and acclimatization of marine fishes to temperature changes 11. Experiments with Fundulus and Atherinops. Biol. Bull. 88: 194-206.
17. FARMER, J.B. et LEVY, G.P. 1970. La différenciation des betâs adrénorécepteurs par l'emploi d'agents bloquants. J. Pharm. Pharmac. G.B. 22: 145-152.

18. FUJII, R. et NOVALES, R.R. 1969 a. The nervous mechanism controlling pigment aggregation in Fundulus melanophores. Comp. Biochem. Physiol. 29: 109-124.
19. FUJII, R. et NOVALES, R.R. 1969 b. Cellular aspects of the control of physiological color changes in fishes. Amer. Zool. 9: 453-463.
20. FURCHGOTT, R.F. 1959. The receptors of epinephrine and norepinephrine (adrenergic receptors). Pharm. Rev. 11: 429-441.
21. FURCHGOTT, R.F. 1967. The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. Annals of the New York Academy of Sciences. New adrenergic blocking drugs: their pharmacological, biochemical and clinical actions 139, art. 3: 553-570.
22. FITZGERALD, J.D. 1969. Perspectives in adrenergic β -receptor blockade. Clin. Pharmacol. and Ther. 10: 292-306.
23. GOLDMAN, J.M. et HADLEY, M.E. 1969. In vivo demonstration of adrenergic receptors controlling melanophore responses of the lizard Anolis carolinensis. J. Pharmac. Exp. Therap. 166: 1-7.
24. GOLDMAN, J.M. et HADLEY, M.E. 1970. Direct agonistic and antagonist effects of ergotamine on vertebrate melanophores. Arch. Int. Pharmacodyn. 183: 239-246.
25. GOODMAN, L.S. et GUILMAN, A. 1970. The Pharmacological Basis of therapeutics. 4th ed. Mac Millan.
26. GROLLMAN, A. et GROLLMAN, E.F. 1970. Pharmacology and therapeutics. 7th ed. Ed. Lea et Febiger. Philadelphia.
27. GULATI, O.D., GOKHALE, S.D. et UDWADIA, B.P. 1965. Antagonism of adrenergic blockade by Pronethalol. Arch. Int. Pharmacodyn. 156: 389-397.

28. GROVE, D.J. 1969 a. The effects of adrenergic drugs on melanophores of the minnow, Phoxinus phoxinus (L). Comp. Biochem. Physiol. 28: 37-44.
29. GROVE, D.J. 1969 b. Melanophores dispersion in the minnow Phoxinus phoxinus (L). Comp. Biochem. Physiol. 28: 55-65.
30. GRUDICELLI, J.F., SCHMITH, H. et BOISSIER, J.R. 1969. Studies on dl-4 (2 hydroxy-3 isopropyl-amino-propoxy)-indol (LB46), a new potent betâ adrenergic blocking drugs. J. Pharm. Exp. Ther. 168: 116-126.
31. HEALEY, E.G. 1951. The colour change of the minnow (Phoxinus laevis) 1. effect of spinal section between vertebrae 5 and 15 on the response on melanophores. J. Exp. Biol. 28: 297-313.
32. HEALEY, E.G. et ROSS, D.N. 1966. The effects of drugs on the background response of the minnow Phoxinus phoxinus (L). Comp. Biochem. Physiol. 19: 545-580.
33. HODGE, R.L. 1964. Adrenergic betâ-receptor-blocking drugs. Current Therapeutics 193: 816-820.
34. HOGBEN, L. et SLOME, D. 1931. The pigmentary effector system VI. The dual character of endocrine coordination on amphibian colour change. Proc. Roy. Soc. B. 108: 10-53.
35. HOLMBERG, Kaj. 1968. Ultrastructure and response to background illumination of the melanophore of the Atlantic Hag fish Myxine glutinosa L. Gen. Comp. Endocr. 10: 421-428.
36. HULL, L.D., ELTHERRINGTON, L.G. et HORITA, A. 1960. The antagonism of adrenergic blockade by dichloroisoproterenol DCI. Experientia 16: 368-369.
37. IWATA, K.S., WATANABE, M. et KURIHARA, T. 1959 a. Changes in the state and response of the fish scale melanophore during continuous immersion in Ringer's solution. Biol. J. Okayama Univ. 5: 185-194.

38. IWATA, K.S., WATANABE, M. et NAGAO, K. 1959 b. The mode of action of pigment concentrating agents on the melanophores in an isolated fish scale. Biol. J. Okayama Univ. 5: 195-206.
39. JACK, M., LEMONT, B.K. et HAYLAND, J.R. 1970. Theoretical considerations of alpha and beta adrenergic activity. Mol. Pharmacol. 7: 328-336.
40. JACOBOWITZ, D. et LATIES, A.M. 1968. Direct adrenergic innervation of teleost melanophore. Anat. Rec. 162: 501-504.
41. KIRSHNER, N., SCHANBERG, S.M. et FERRIS, R.M. 1971. Molecular aspects of the storage and uptake of catecholamines. Advances in drug research. N.J. Harper et Alma B. Simmonds, Eds. Academic Press, New York.
42. MARSLAND, D.A. et MEISNER, D. 1967. Effect of D₂O on the mechanism of pigment dispersal in the melanocytes of Fundulus heteroclitus: a pressure-temperature analysis. J. Cellular Physiol. 70: 209-216.
43. MARTEL, R.R., BERMAN, R. et BELLEAU, B. 1969. Pharmacology of EEDQ (N-ethoxy carbonyl-2-ethoxy 1,2 dihydroquinoline). Can. J. Physiol. Pharmac. 47: 909-912.
44. MAZURKIEWIEWICZ-KUILECKI, I.M. 1970. Interaction on beta blocking agents with noradrenaline in vascular smooth muscle. Europ. J. of Pharmacol. 11: 155-162.
45. MOORE, G.E. et O'DONNELL, S. 1970. A potent beta adrenoreceptor blocking drug: 4 (2 hydroxy 3 isopropyl aminopropoxy) indol. L.B. 46 Sandoz. (Prinodolol). J. Pharma. Pharmac. 22: 180-188.
46. MERCK Index. 1968. 8th edition, Ed. Paul G. Stecher. N.Y. U.S.A. 1713 pages.
47. NICKERSON, M. 1967. New developments in adrenergic blocking drugs. Ann. N.Y. Acad. Sc. 139: 571-580.

48. NOVALES, R.R. 1971. On the role of cyclic AMP in the function of skin melanophores. Ann. N.Y. Acad. Sci. 185: 494-506.
49. NOVALES, R.R. et DAVIS, W.J. 1967. Melanine dispersing effect of adenosine 3'5' monophosphate on amphibian melanophores. Endocrinology 81: 283-290.
50. NOVALES, R.R. et NOVALES, R.J. 1966. Electron microscopic studies of pigment movements in melanophores. Amer. Zool. 6: 576.
51. OLIVARES, G.J., SMITH, N.T. et ARONOW, L. 1967. Effect of propranolol on alpha-adrenergic blockade in the dog and isolated rabbit aortic strip. Brit. J. Pharmacol. Chemother. 30: 240-250.
52. PARKER, G.H. 1948. Animal colour changes and their neurohumours. Cambridge Univ. Press. Cambridge England.
53. PATIL, P.N., TYE, A., MAY, C., HETLEY, S. et MIYAGI, S. 1968. Steric aspects of adrenergic drugs XI. Interactions of dibenamine and beta adrenergic blockers. J. Pharmacol. Exp. Ther. 163: 309-319.
54. PUIG, M. et KIRPEKAR, S.M. 1971. Inhibitory effect of low pH on norepinephrine release. Pharmacol. Ther. 176: 134-138.
55. PYE, J.D. 1964 a. Nervous control of chromatophores in teleost fish 1. Electrical stimulation in the minnow Phoxinus phoxinus L. J. Exp. Biol. 41: 525-534.
56. PYE, J.D. 1964 b. Nervous control of chromatophores in teleost fish 2. The influence of certain drugs in the minnow Phoxinus phoxinus L. J. Exp. Biol. 41: 535-541.
57. ROBINSON, G.A. et SUTHERLAND, E.W. 1970. Cyclic AMP and the function of eukaryotic cells, an introduction. Cyclic AMP and cell function. Ann. N.Y. Acad. Sci. 185: 5-10.
58. ROSEN, O.M. et EINSTEIN, A. 1971. Structure-activity relationships of adrenergic compounds that act on adenylyl cyclase of frog erythrocytes. Annual reports in medicinal chemistry 1970. Academic Press, New York London 1971.

59. SCOTT, G.T. 1965. Physiology and pharmacology of color change in the sand flounder *Schophthalmus*. Limnol. Oceanog. 10: R230-R246.
60. SPAETH, R.A. 1916. Evidence proving the melanophore to be a disguised type of smooth muscle cell. J. Exp. Zool. 20: 193-215.
61. SPAETH, R.A. et BARBOUR, H.G. 1917. The response of fish melanophore to sympathetic stimulants and depressants. J. Pharmacol. Exptl. Therap. 9: 356-357.
62. WATANABE, M., KOBAYASHI, M. et IWATA, K.S. 1962. The action of certain autonomic drugs in the fish melanophores. Biol. J. Okayama Univ. 8: 103-114.
63. WICKERSON, M. 1949. The pharmacology of adrenergic blockade. Pharmac. Rev. 1: 27-101.
64. WILLIAMS, R.L., HAINES, J.E. et PEARSON, J.E. 1972. Comparison of cholinergic and beta-adrenergic stimulation in the autoperfused kidney. Arch. Int. Pharmacodyn. 196: 393-403.
65. YAMAMURA, H.I. et AKIRA, H. 1968. Effect of propranolol on the blockade of alpha adrenergic receptors. J. Pharmacol. Exp. Ther. 164: 82-89.
66. YOUNG, M.S. et MARKS, G.S. 1969. Studies of the chemical nature of adrenergic receptors 111. Further investigation in the labelling procedure. Biochem. Pharmac. 18: 1609-1618.